

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionale durchflusszytometrische Analyse der Thrombozyten im Bereich der  
primären Hämostase im Verlauf der essentiellen Thrombozythämie

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

Vorgelegt von

Alice Tien-Yue Huang  
aus Karlsruhe

Mainz, 2020

Tag der Promotion: 8.12.2020

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	10
Abbildungsverzeichnis .....	13
Tabellenverzeichnis .....	22
1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Literaturdiskussion.....	25
2.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN) .....	25
2.2 Essentielle Thrombozythämie.....	26
2.2.1 Epidemiologie .....	26
2.2.2 Pathophysiologie und Molekulargenetik .....	26
2.2.2.1 <i>JAK2</i> V617F-Mutation.....	27
2.2.2.2 <i>CALR</i> -Mutationen.....	28
2.2.2.3 <i>MPL</i> -Mutationen.....	29
2.2.2.4 Weitere Mutationen .....	30
2.2.3 Klinik .....	30
2.2.3.1 Thrombosen .....	30
2.2.3.2 Blutungsneigung .....	31
2.2.3.3 Weitere Symptome.....	32
2.2.4 Diagnostik .....	32
2.2.5 Differentialdiagnose .....	33
2.2.6 Therapie.....	34
2.2.6.1 Sehr Niedrig-Risiko-Patienten.....	34
2.2.6.2 Niedrig-Risiko-Patienten .....	35
2.2.6.3 Intermediär-Risiko-Patienten .....	35
2.2.6.4 Hoch-Risiko-Patienten .....	35
2.2.6.5 Therapeutisches Management bei erworbenem VWS .....	35
2.2.6.6 Eingesetzte Substanzen .....	36

2.2.6.6.1	Aspirin (ASS).....	36
2.2.6.6.2	Hydroxyurea (HU) .....	37
2.2.6.6.3	Zweitlinien Therapie .....	38
2.2.6.6.3.1	Interferon- $\alpha$ .....	38
2.2.6.6.3.2	Anagrelid .....	39
2.2.6.6.3.3	Busulfan.....	40
2.2.6.6.3.4	Ruxolitinib .....	40
2.2.6.6.3.5	Thrombozyten-Apherese .....	40
2.2.6.7	therapeutisches Ansprechen .....	41
2.2.6.8	Prognose und Ausblick .....	42
2.3	Humane Thrombozyten .....	42
2.3.1	Anatomie der Thrombozyten .....	42
2.3.2	Thrombozyten und Hämostase .....	43
2.3.2.1	Thrombozytenaktivierung in der primären Hämostase .....	44
2.3.2.1.1	Thrombozytenadhäsion.....	44
2.3.2.1.2	Thrombozytäre Granulasekretion.....	45
2.3.2.1.3	Thrombozytenaggregation .....	45
2.3.2.2	Thrombozyten in der sekundären Hämostase .....	46
2.3.2.3	Signalwege der Thrombozyten .....	47
2.3.2.3.1	Aktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)....	47
2.3.2.3.1.1	Agonist Adenosindiphosphat (ADP) .....	47
2.3.2.3.1.2	Agonist Thromboxan A2 .....	48
2.3.2.3.1.3	Agonist Serotonin .....	48
2.3.2.3.1.4	Agonist Thrombin .....	48
2.3.2.3.2	Aktivierung über Kollagen .....	49
2.3.2.3.3	Aktivierung über Kollagen plus Thrombin .....	50

2.3.2.3.4	Rolle der extrazellulären Protein Disulfid Isomerase (PDI) bei der Thrombozyten-Aktivierung .....	51
3	Material und Methoden .....	52
3.1	Geräte .....	52
3.2	Verbrauchsmaterial .....	53
3.3	Reagenzien .....	53
3.4	Antikörper .....	54
3.5	Software .....	55
3.6	Studiendesign .....	55
3.7	Probanden und Patienteneinschluss .....	56
3.7.1	Fallzahl .....	56
3.7.2	Genehmigung .....	56
3.7.3	Patienten-und Kontrollprobandenrekrutierung sowie Ein-und Ausschlusskriterien .....	57
3.7.4	Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung .....	57
3.7.5	Statistische Datenauswertung .....	58
3.8	Venöse Blutentnahme .....	58
3.9	Preparation von Plättchen-reichem Plasma (PRP) .....	59
3.10	Durchflusszytometrie .....	60
3.10.1	Technisches Prinzip .....	60
3.11	Versuchsdurchführung .....	62
3.11.1	Thrombozytenfunktionstest .....	62
3.11.1.1	Thrombozyten-Agonisten .....	62
3.11.1.2	Thrombozyten-Aktivierung .....	63
3.11.1.3	Plättchenfixierung und Plättchenwaschen .....	63
3.11.1.4	Antikörper-Markierung (Aktivierungsmarker) .....	64
3.11.1.5	Messung am Durchflusszytometer .....	65

3.11.2	Assay zur Analyse der PDI-Expression auf der Thrombozyten-Oberfläche .....	65
3.11.3	Assay zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) ..	66
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Deskriptive Statistik.....	67
4.1.1	Patienten-und Probandencharakteristika .....	67
4.2	Explorative Datenanalyse .....	72
4.2.1	Gruppenvergleich .....	72
4.2.1.1	Vergleich der Granulasekretion (CD62P, CD63, LAMP-1) .....	72
4.2.1.1.1	Vergleich der basalen Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche .....	72
4.2.1.1.2	Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml).....	73
4.2.1.1.3	Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml).....	75
4.2.1.1.4	Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml) plus Thrombin (0,2 U/ml).....	77
4.2.1.1.5	Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Ca <sup>2+</sup> Ionophor (20 µM).....	78
4.2.1.1.6	Vergleich der CD62P-Expression auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit ADP sowie nach kombinierter Aktivierung mit Convulxin plus ADP bzw. Thrombin plus ADP .....	79
4.2.1.2	Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme in die δ-Granula und Mepacrine-Freisetzung aus den δ-Granula .....	80
4.2.1.3	Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor-Aktivierung (Fibrinogen-, PAC-1-Bindung).....	82
4.2.1.3.1	Vergleich der basalen Bindungskapazität von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa Rezeptor und dessen Aktivierung (PAC-1-AK Bindung) .....	82

4.2.1.3.2	Vergleich der Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin (0,2 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml).....	83
4.2.1.3.3	Vergleich der Aktivierung des thrombozytären GPIIb/IIIa Rezeptors nach Aktivierung mit Ca <sup>2+</sup> Ionophor 20 µM .....	85
4.2.1.4	Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung <i>ex vivo</i> und nach Stimulierung <i>in vitro</i> .....	87
4.2.1.4.1	Vergleich der thrombozytären basalen VWF-Bindung sowie Aktivierung des GPIIb $\alpha$ Rezeptors nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml).....	87
4.2.1.4.2	Vergleich der thrombozytären VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin 1 mg/ml .....	89
4.2.1.5	Vergleich der PDI Oberflächenexpression auf den Thrombozyten..	90
4.2.1.6	Vergleich der Analyse des mitochondrialen Membranpotentials der Thrombozyten mithilfe von JC-1.....	91
4.2.2	Intra-individueller Vergleich der Thrombozytenfunktion– Einschluss vs. 1.FU	92
4.2.2.1	Vergleich der Thrombozytenfunktion bei 1.FU ET Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen .....	93
4.2.2.1.1	Vergleich der thrombozytären $\alpha$ -Granula-Freisetzung.....	93
4.2.2.1.2	Vergleich der thrombozytären lysosomalen- und $\delta$ -Granula-Freisetzung (CD63, LAMP-1- Oberflächenexpression) .....	97
4.2.2.1.3	Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung .....	100
4.2.2.1.4	Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa Aktivierung .....	101
4.2.2.1.5	Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung.....	105
4.2.2.1.6	Vergleich der thrombozytären PDI Oberflächenexpression ....	107
4.2.2.1.7	Vergleich des thrombozytären mitochondrialen Membranpotenzials (JC1-1) .....	108

4.2.2.2	Intra-individueller Vergleich der Thrombozytenfunktion bei 1.FU ET Patienten mit klinischen und therapeutischen Veränderungen .....	108
4.2.2.2.1	Vergleich der thrombozytären $\alpha$ -Granula-Freisetzung .....	109
4.2.2.2.2	Vergleich der thrombozytären lysosomalen- und $\delta$ -Granula-Freisetzung (CD 63, LAMP-1).....	112
4.2.2.2.3	Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung .....	115
4.2.2.2.4	Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa Aktivierung .....	116
4.2.2.2.5	Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung.....	119
4.2.2.2.6	Vergleich der PDI Oberflächenexpression auf Thrombozyten	121
4.2.2.2.7	Vergleich des thrombozytären MMP (JC-1) .....	121
5	Diskussion .....	123
5.1	Vergleich der Thrombozytenfunktion gesunder Kontrollprobanden mit und ohne ASS Einnahme.....	123
5.2	Abnormalitäten der Thrombozyten-Funktion von ET Patienten bei der 1. FU	124
5.2.1	Hypofunktion der Thrombozyten bei Patienten mit ET .....	125
5.2.1.1	$\delta$ -„Storage Pool Deficiency“ ( $\delta$ -SPD), GPVI-Defekt und lysosomale Störung bei Patienten mit ET .....	125
5.2.1.2	Störung der thrombozytären GPIIb/IIIa-Aktivierung bei Patienten mit ET	128
5.2.1.3	Verminderte thrombozytäre Bindung des VWF bei Patienten mit ET	130
5.2.1.4	Exemplarische Patienten der ET Kohorte mit hypoaktiven Thrombozyten-Profil .....	132
5.2.2	Erhöhte Aktivierung und Hyperfunktion der Thrombozyten bei Patienten mit ET im 1.FU.....	133
5.2.2.1	Erhöhte P-Selektin Expression auf Thrombozyten bei Patienten mit ET und <i>JAK2</i> V617F Mutation.....	133

5.2.2.2	Erhöhte PDI-Präsentation auf der Oberfläche der Thrombozyten bei Patienten mit ET .....	136
5.2.2.3	Erhöhtes MMP der Thrombozyten bei Patienten mit ET .....	136
5.2.2.4	Exemplarische Patienten der ET Kohorte mit hyperaktiven Thrombozyten- Profil .....	137
5.3	Besondere Veränderungen der Thrombozyten-Funktion bei Patienten mit ET im 1.FU im Vergleich zum Ersteinschluss.....	139
6	Zusammenfassung .....	144
7	Literaturverzeichnis .....	147

## Abkürzungsverzeichnis

δ- SPD	δ- "Storage Pool Deficiency"
1.FU	1.Follow-up
5-HT	5-Hydroxytyramin
a.e.	Am ehesten
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
Akt/Ag	Aktivität/Antigen
AML	Akute myeloische Leukämie
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin (Handelsname)
AU	arbitrary units
Bzw.	Beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CML	Chronische myeloische Leukämie
COAT	Collagen and thrombin
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CTH	Centrum für Thrombose und Hämostase
CVRF	Kardiovaskuläre Risikofaktoren
Cvx	Convulxin
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPOR	Erythropoietin Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Ersteinschluss
ET	Essentielle Thrombozythämie
FA	Formaldehyd
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter Channel
G-CSFR	Granulocyte colony stimulating factor receptor
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren

GPRP	Gly- Pro- Arg- Pro
HBSS	Hank's balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
HU	Hydroxyurea
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura
IWG-MRT	International Working Group- Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment
JAK2	Januskinase 2
KCl	Kaliumchlorid
LAMP-1	lysosomal associated membrane protein 1
LIMP-1	lysosomal integral membrane proteine 1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMP	mitochondriales Membranpotential
MPL	Myeloproliferative Leukemia
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MZS	Mikrozirkulationsstörungen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PAR	“proteinase-activated receptor” Rezeptoren
PBS	phosphate buffered solution
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PE	R-Phycoerythrin
PLC-beta	Phospholipase C-beta
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase C $\gamma$ 2
PMF	Primäre Myelofibrose
Post-ET-MF	Post-ET-Myelofibrose
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
PV	Polyzythämia vera

RBC	red blood cell
SSC	side scatter channel
Thr	Thrombin
TPO	Thrombopoietin
TSP-1	Thrombospondin-1
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TZ	Thrombozyt
VWF	Von Willebrand Faktor
VWS	Von Willebrand Syndrom
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Pathogenese der Thrombopoese bei der essentiellen Thrombozythämie. (A) Physiologische Thrombopoese. (B) Durch eine Mutation der hämatopoetischen Stammzelle kommt es zu einer klonalen Proliferation mit exzessiver Plättchenproduktion. Schema modifiziert nach Cazzola et al. [10] Abkürzungen: HSC: Hämatopoetische Stammzelle, MZ: Megakaryozyt, TZ: Thrombozyt. ....	27
Abbildung 2: JAK2-vermittelte Signaltransduktion: Physiologisch und bei <i>JAK2 V617F</i> -Mutation. (A) Keine JAK2-Mutation. Bindet kein Ligand an den EPO-, TPO-, G-CSF-Rezeptor so wird die Kinasedomäne JH1 von JH2 inhibiert. (B) Sobald ein Ligand bindet, kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors und die Kinasedomäne JH1 wird nicht mehr durch JH2 inhibiert. Es kommt zu einer Signalweiterleitung über die STAT-Kaskade. (C) Liegt eine <i>JAK2- JAK2 V617F</i> Mutation vor, wird die Kinasedomäne JH1 nicht durch die mutierte Domäne JH2 inhibiert, sodass der Rezeptor permanent aktiv ist. Schema modifiziert nach Bennett M. et al. (2006) [16] .....	28
Abbildung 3: Signaltransduktion bei einer <i>CALR</i> -Mutation. (A) Aufgrund einer <i>CALR</i> -Mutation kommt es zu einer gestörten Interaktion zwischen dem mutierten Calreticulin im endoplasmatischen Retikulum und des TPO-Rezeptors (MPL). Die Folge davon ist eine permanente und TPO-unabhängige Aktivierung des TPO-Rezeptors über JAK2 Aktivierung. (B+C) Physiologischer TPO-Rezeptor. Im unmutierten Zustand ist der TPO-Rezeptor erst nach Ligandenbindung aktiviert. Schema modifiziert nach Cazzola M. et al (2016) [10] .....	29
Abbildung 4: Diagnose Algorithmus ET. Schema modifiziert nach Tefferi A. et al (2015) [38] .....	33
Abbildung 5: Therapiealgorithmus modifiziert nach Tefferi A. et al (2019) [7] .....	36
Abbildung 6: Primäre Hämostase. ....	46
Abbildung 7: Übersicht der thrombozytären Signaltransduktionswege, modifiziert nach Jurk K. (2015) [88], [91] Abkürzungen: vWF: von Willebrand Faktor, PAR: „protease-activated receptor“, GP: Glykoprotein, PLC: Phospholipase C, DAG: Diacylglycerin, IP <sub>3</sub> : Inositoltriphosphat, PKC: Proteinkinase C; TxA <sub>2</sub> : Thromboxan A <sub>2</sub> , TP: Thromboxan Rezeptor, AA: Arachnoidonsäure, COX-1: Cyclooxygenase 1, PI3K:	

Phosphoinositid-3-Kinase, Akt: Proteinkinase B, PLA2: Phospholipase A 2, PDI: Proteindisulfidisomerase, 5HT: 5-Hydroxytyramin; Serotonin.....	49
Abbildung 8: Study Flow der ET-Studie 837.262.16 (10581); EK Genehmigung vom 04.08.2016. ....	56
Abbildung 9: Schema zur Gewinnung von PRP aus peripherem Citrat-Vollblut mittels Zentrifugation. ....	60
Abbildung 10: Exemplarische Datenauswertung am Durchflusszytometer. (A) Dot plot von mit Mepacrine-gefärbten und mit Thrombin 0,2 U/ml aktivierten humanen Thrombozyten eines Kontrollprobanden ohne ASS mit der FSC (X-Achse) gegen die SSC (Y-Achse). (B) Histogramm mit der FITC-Fluoreszenzintensität (X-Achse) gegen die Anzahl (Y-Achse). ....	61
Abbildung 11: Übersicht der Thrombozytenkonzentration im Ersteinschluss, 1.Follow-Up (1.FU) und der Kontrollen mit ASS (K-mit ASS) und ohne ASS (K-ohne ASS) bei (A) ET Patienten ohne Therapiewechsel und (B) ET Patienten mit Therapiewechsel auf Anagrelid (P9, P10), Interferon-alpha (P12) und keine Zytoreduktion (P13). ET-Thrombozyten-Konzentrations-Marke bei $450 \times 10^9/L$ , K-mit ASS und K-ohne ASS mit angegebenem Mittelwert. *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	71
Abbildung 12: Basale Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.....	72
Abbildung 13: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.....	73
Abbildung 14: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	75
Abbildung 15: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml)+ Thrombin (0,2 U/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. 77	77

Abbildung 16: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit $\text{Ca}^{2+}$ Ionophor (20 $\mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	78
Abbildung 17: Expression von CD62P mit (A) ADP (0,375 $\mu\text{M}$ ) und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml)+ ADP (0,375 $\mu\text{M}$ ) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ ADP (0,375 $\mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	79
Abbildung 18: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) der Thrombozyten von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	81
Abbildung 19: Basale Bindung an den GPIIb/IIIa (A) von Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	82
Abbildung 20: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (B) Thrombin (0,2 U/ml) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml). PAC-1-AK Bindung nach Aktivierung mit (D) Convulxin (20 ng/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml) und (F) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	83
Abbildung 21: Bindung an den GPIIb/IIIa (A) von Fibrinogen (Fib) und (B) PAC-1 nach Aktivierung mit $\text{Ca}^{2+}$ Ionophor (20 $\mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	85
Abbildung 22: Bindung von vWF (A) basal und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	87

Abbildung 23: Bindung von VWF nach Aktivierung mit Ristocetin (1mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.....	89
Abbildung 24: Mittlere Fluoreszenzintensität der PDI auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe. ....	90
Abbildung 25: Quotientendarstellung von JC-1 der Thrombozyten von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.....	91
Abbildung 26: CD62P Expression (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende: .....	93
Abbildung 27: CD62P Expression nach Aktivierung mit (A) ADP (0,375 $\mu$ M), (B) Convulxin (20 ng/ml)+ ADP (0,375 $\mu$ M) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ ADP (0,375 $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, ADP: Adenosindiphosphat. Farblegende: .....	95
Abbildung 28: CD62P Expression nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor (20 $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: .....	96
Abbildung 29: basale Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: .....	97

- Abbildung 30: CD63 Expression nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* + HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). LAMP-1 Expression nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden (angegeben ist der Mittelwert) mit bzw. ohne ASS. Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende: ..... 98
- Abbildung 31: Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 nach Aktivierung mit  $Ca^{2+}$  Ionophor (20  $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: ..... 99
- Abbildung 32: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Abkürzungen: K-ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert): Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende: ..... 100
- Abbildung 33: basale Bindung von (A) Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: ..... 101
- Abbildung 34: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). PAC-1 Bindung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F*+ HU, *JAK2 V617F*- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der

Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende: .....	102
Abbildung 35: Fibrinogen Bindung (A) und PAC-1 Bindung (B) nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor (20 $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: .....	104
Abbildung 36: VWF Bindung (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende: .....	105
Abbildung 37: VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin (1 mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: .....	106
Abbildung 38: PDI Oberflächenexpression auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:	107
Abbildung 39: Darstellung des MMP der Thrombozyten von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F+ HU, <i>JAK2</i> V617F- HU und <i>CALR</i> + HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende: .....	108
Abbildung 40: CD62P Expression (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, *: Post-ET-PMF. Farblegende: .....	109
Abbildung 41: CD62P Expression nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor (20 $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen	

und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, ADP: Adenosindiphosphat, *: Post-ET-MF. Farblegende: .....	110
Abbildung 42: CD62P Expression nach Aktivierung mit Ca <sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	111
Abbildung 43: basale Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	112
Abbildung 44: CD63 Expression nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). LAMP- 1 Expression nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, *: Post-ET- MF. Farblegende:.....	113
Abbildung 45: Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 nach Aktivierung mit Ca <sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende: .....	114
Abbildung 46: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2</i> V617F und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-	

mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	115
Abbildung 47: basale Bindung von (A) Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	116
Abbildung 48: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). PAC-1 Bindung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	117
Abbildung 49: : Fibrinogen Bindung (A) und PAC-1 Bindung (B) nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor (20 $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	118
Abbildung 50: VWF Bindung (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	119
Abbildung 51: VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin (1 mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit <i>JAK2 V617F</i> und <i>CALR</i> Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, *: Post-ET-MF. Farblegende:.....	120

Abbildung 52: PDI Oberflächenexpression auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK 2V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS; \*: Post-ET-MF. Farblegende: ..... 121

Abbildung 53: Darstellung des MMP der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende: ..... 121

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp, modifiziert nach Rumi, E. et al (2017) [3], [25] .....	30
Tabelle 2: ET-WHO Diagnosekriterien von 2016, modifiziert nach Rumi, E. et al (2017) [3] .....	32
Tabelle 3: Übersicht der am häufigsten eingesetzten Substanzen bei ET .....	41
Tabelle 4: Kriterien der kompletten und partiellen Remission.....	41
Tabelle 5: Übersicht der thrombozytären Granula und ihre Inhaltsstoffe, modifiziert nach Jurk et al. [70], .....	43
Tabelle 6: Auflistung der angewendeten Geräte mit Typ-und Herstellerangabe .....	52
Tabelle 7: Auflistung der angewendeten Verbrauchsmaterialien mit Typ-und Herstellerangabe .....	53
Tabelle 8: Auflistung der angewendeten Reagenzien mit Angabe der Bezugsquelle .....	53
Tabelle 9: Auflistung der angewendeten Antikörper mit Angabe des Klons, Isotyps, Konjugation und Bezugsquelle.....	54
Tabelle 10: Auflistung der angewendeten Software mit Herstellerangabe .....	55
Tabelle 11: Pipettierschema der Agonisten in aufsteigender Konzentration.....	62
Tabelle 12: Überblick der thrombozytären Aktivierungsmarker und den zugehörigen Targets. [111] .....	64
Tabelle 13: Übersicht der klinischen und demographischen Eigenschaften der 1.FU ET Patienten. ....	69
Tabelle 14: Übersicht der Laborparameter der 1.FU ET Patienten.....	70
Tabelle 15: Übersicht der Kontrollprobanden mit jeweils 10 Probanden vor und nach 3 tägiger ASS-Einnahme (100g). ....	71
Tabelle 16: Übersicht der p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor (20 $\mu$ M). ....	79
Tabelle 17: Übersicht der p-Werte nach thrombozytärer Fibrinogen-Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml). ....	84

Tabelle 18: Übersicht der p-Werte der thrombozytären PAC-1 Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml).  
 ..... 85

Tabelle 19: Übersicht der p-Werte nach thrombozytärer Fibrinogen-Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit  $Ca^{2+}$  Ionophor (20  $\mu$ M). ..... 86

Tabelle 20: Übersicht der p-Werte der thrombozytären PAC-1 Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit  $Ca^{2+}$  Ionophor (20  $\mu$ M)..... 86

Tabelle 21: Übersicht der p-Werte der thrombozytären VWF Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml).  
 ..... 88

## 1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Von einer unkontrollierten Megakaryopoese mit resultierender erhöhter Thrombozytenkonzentration ist die essentielle Thrombozythämie (ET) als eine myeloproliferative Erkrankung gekennzeichnet. Die prognostischen und die Lebensqualität beeinflussenden Auswirkungen dieser Erkrankung werden hauptsächlich durch thromboembolische und hämorrhagische Ereignisse bestimmt. In der Vergangenheit wurde die erhöhte Thrombozytenkonzentration per se oft als Ursache der Thrombose vermutet, was allerdings nicht abschließend bestätigt werden konnte. Die Entdeckung der zugrunde liegenden „driver Mutationen“ (*JAK2 V617F*, *CALR*, *MPL*) der ET bildete einen Meilenstein im Verständnis der ET. Die klinische und experimentelle Forschung der letzten Jahre richtete die Aufmerksamkeit auf die Untersuchung der Thrombozyten-Funktion, um das Paradoxon zwischen thrombotischer und hämorrhagischer Tendenz aufzuschlüsseln. In wieweit eine mögliche thrombozytäre Dysfunktion jedoch zum Verständnis der Pathogenese der klinischen Manifestationen der ET beiträgt, ist bisher trotz jahrelanger Forschung unzureichend verstanden.

In Anlehnung daran bin ich der Hypothese nachgegangen, dass tendenziell eher die Thrombozyten-Dysfunktion als die Thrombozytenkonzentration entscheidend für die klinische Ausprägung der Hämostasestörung bei der ET ist. Ziel dieser Arbeit ist es daher, anhand der durchflusszytometrischen Funktionsanalyse der Thrombozyten einer ET Follow up- Patientenkohorte die Frage nach einer potenziellen Dysfunktion der Thrombozyten und dessen Pathogenese weiter zu evaluieren. Außerdem soll der Vergleich zwischen Ersteinschluss und der Folgeuntersuchung nach einem Jahr (1.FU) in Zusammenschau mit Therapie sowie klinischen und laborchemischen Parametern uns ermöglichen, das Verständnis der ET zu vertiefen. Dies soll dazu dienen, mögliche individuelle Risikofaktoren von krankheitsbeeinflussenden Faktoren wie Thrombosen, Blutungen, aber auch einer Progression der Erkrankung identifizieren zu können.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Myeloproliferative Neoplasien (MPN), auch bekannt unter dem myeloproliferativen Syndrom (MPS), gehören zum Spektrum der hämatoonkologischen Erkrankungen. Das Hauptcharakteristikum der MPN ist eine autonome Proliferation, ausgehend von einer myeloischen Stammzelle, einer oder mehreren Zellreihen (Leuko-, Erythro-, Thrombozytose) [1].

Der in Russland geborene amerikanische Hämatologe William Dameshek fasste 1951 erstmalig folgende Krankheiten als MPN zusammen [2]:

1. Polyzythämia vera (PV)
2. Essentielle Thrombozythämie (ET)
3. Primäre Myelofibrose (PMF)
4. Chronische myeloische Leukämie (CML)

Aufgrund einiger genetischen Gemeinsamkeiten werden PV, ET und PMF als Philadelphia-negative klassifiziert [3].

Die Polyzythämia vera wird charakterisiert durch eine gesteigerte Proliferation aller drei Zellreihen, wobei die Erhöhung der Erythropoese im Vordergrund steht [4]. Im Gegensatz dazu wird die primäre Myelofibrose durch eine Trias aus hochgradiger Markfibrose, extramedullärer Blutbildung in Milz und Leber sowie einer Splenomegalie definiert [5]. Bei der chronischen myeloischen Leukämie kommt es zu einer massiven Erhöhung von reifen Granulozyten.

Da die essentielle Thrombozythämie Gegenstand dieser Arbeit ist, wird diese im folgenden Kapitel näher erläutert.

Jede der MPN kann in eine der andere MPN übergehen und sich darüber hinaus zu einer akuten myeloischen Leukämie (AML) entwickeln.

Als wichtige Differentialdiagnose zu den MPN ist an dieser Stelle das myelodysplastische Syndrom (MDS) zu nennen. Obwohl die Übergänge fließend sind, zeichnet sich das MDS durch ein Grundmerkmal aus: Durch eine Ausreifungsstörungen der Blutbildung im Knochenmark werden sogenannte dysplastische Zellen produziert. Diese führen zu einer Zytopenie im Blut (Anämie, Leukopenie oder Thrombopenie) [6].

## 2.2 Essentielle Thrombozythämie

Die essentielle Thrombozythämie ist gekennzeichnet durch eine autonome monoklonale Proliferation von Thrombozyten und zählt zu den Philadelphia negativen MPN [7].

1920 beschrieb der italienische Hämatologe Di Guglielmo erstmals einen klinischen Fall einer myeloproliferativen Neoplasie mit erhöhter Thrombozyten-Konzentration. Als eigene klinische Entität wurde die essentielle Thrombozythämie von Reid 1940 zum ersten Mal klassifiziert [8].

### 2.2.1 Epidemiologie

Die ET ist eine seltene onkologische Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,38 bis 1,7 pro 100.000 Personen jährlich [3]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 55-60 Jahren und das Geschlechterverhältnis beträgt männlich zu weiblich 1,5:1 [1].

### 2.2.2 Pathophysiologie und Molekulargenetik

Die physiologische Bildung von den Thrombozyten, die Thrombopoese, erfolgt im Knochenmark nach Aktivierung über verschiedene Reize, beispielsweise dem Thrombopoietin (TPO). Ausgehend von der myeloischen Stammzelle folgt die Bildung von Megakaryozyten, von welchem im peripheren Blut die Thrombozyten abgeschnürt werden [9].

Pathophysiologisch ist die Ursache der ET eine spontane Mutation in Rezeptoren, die für die Regulation der Thrombopoese verantwortlich sind. Dabei kommt es zu einer Aktivierung dieser Rezeptoren ohne ein vorangegangenes Aktivierungssignal. Daraus wiederum resultiert eine unkontrollierte und exzessive Produktion von Thrombozyten aus Megakaryozyten (Abb. 1) [10].

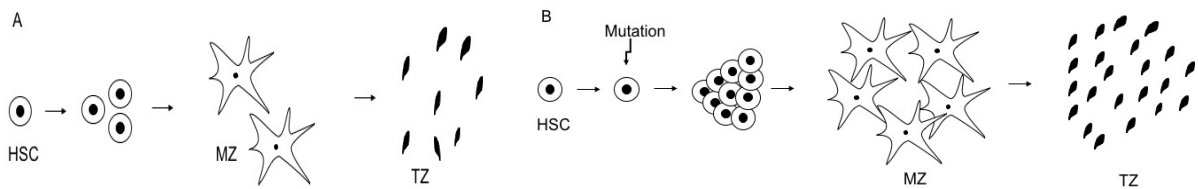


Abbildung 1: Schematische Pathogenese der Thrombopoese bei der essentiellen Thrombozythämie. (A) Physiologische Thrombopoese. (B) Durch eine Mutation der hämatopoetischen Stammzelle kommt es zu einer klonalen Proliferation mit exzessiver Plättchenproduktion. Schema modifiziert nach Cazzola et al. [10] Abkürzungen: HSC: Hämatopoetische Stammzelle, MZ: Megakaryozyt, TZ: Thrombozyt.

Molekulargenetisch liegen den MPN drei heutzutage bekannte Driver-Mutationen zugrunde. Als Driver-Mutation bezeichnet man eine meist erworbene Mutation, die an einer entscheidenden Stelle in der Signalkaskade stattfindet und somit zur unkontrollierten Proliferation der Tumorzelle führt [11].

#### 2.2.2.1 *JAK2* V617F-Mutation

Die mit 60% bis 65% am häufigsten und im Jahre 2005 entdeckte Driver-Mutation liegt im *JAK2* (V617F) Gen, das für die Januskinase 2 (*JAK2*) kodiert [12-14], Januskinasen sind im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinasen und bilden gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor STAT den *JAK/STAT*/Signalweg und sind damit unmittelbar an der Genregulation beteiligt [15]. Die *JAK-2*-Kinase interagiert mit drei Rezeptoren: Erythropoietin Rezeptor (EPOR), Thrombopoietin Rezeptor (MPL (myeloproliferative leukemia) und Granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSFR) [12]. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Proliferation aller drei Zellreihen, der Erythropoese, Thrombopoese und Granulozytopoese.

Auf molekularer Ebene sind die Domänen JH1 und JH2 auf der *JAK2* für deren Aktivität entscheidend. JH1 bildet die eigentliche Kinase des Rezeptors. JH2 hingegen besitzt keine katalytische Aktivität und wird daher auch als Pseudokinase bezeichnet. Die Funktion der JH2-Domäne liegt darin, die JH1-Domäne zu inaktivieren und stellt damit sicher, dass sich *JAK2* nicht in einem Zustand der Daueraktivierung befindet [16].

Infolge der *JAK2* V617F Mutation kommt es zu einem Austausch der Nucleinbase von Guanin in Thymin im Exon 14 von *JAK2*. Dies führt zu einer Substitution der Aminosäure Valin zu Phenylalanin im Codon 617. Das wiederum hat eine veränderte JH2-Domäne zur Folge, wodurch die JH1-Domäne nicht mehr inhibiert wird [17]. Aufgrund des Wegfalls der Inhibition kommt es zu einer konsekutiven und

ligandenunabhängigen Aktivierung dieser Rezeptoren und damit zu einer unkontrollierten Zellproduktion der hämatopoetischer Zellen (Abb. 2).

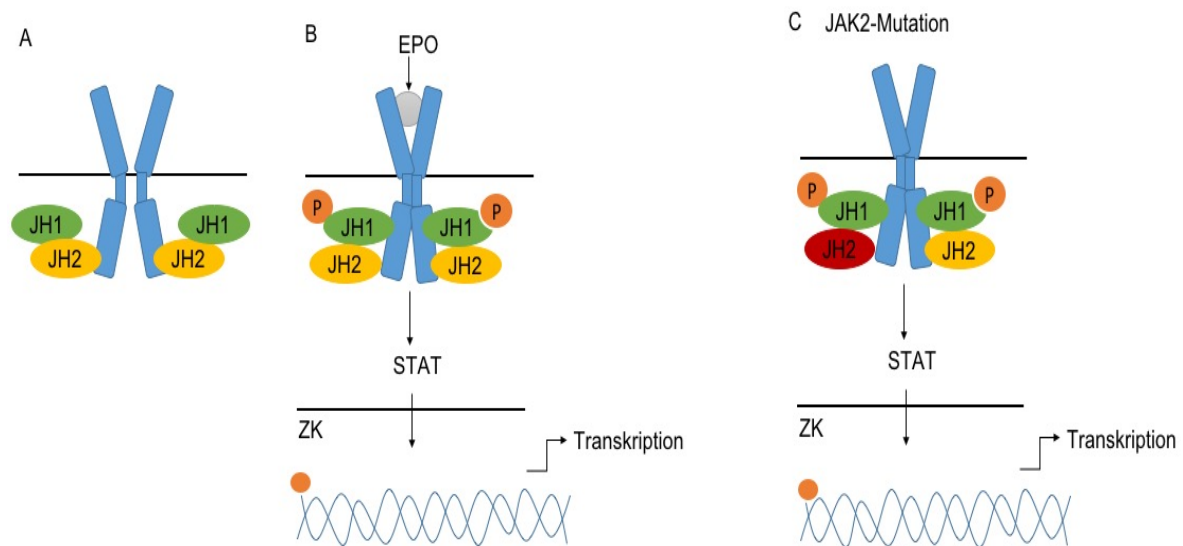


Abbildung 2: JAK2-vermittelte Signaltransduktion: Physiologisch und bei *JAK2* V617F-Mutation. (A) Keine *JAK2*-Mutation. Bindet kein Ligand an den EPO-, TPO-, G-CSF-Rezeptor so wird die Kinasedomäne JH1 von JH2 inhibiert. (B) Sobald ein Ligand bindet, kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors und die Kinasedomäne JH1 wird nicht mehr durch JH2 inhibiert. Es kommt zu einer Signalweiterleitung über die STAT-Kaskade. (C) Liegt eine *JAK2*- *JAK2* V617F Mutation vor, wird die Kinasedomäne JH1 nicht durch die mutierte Domäne JH2 inhibiert, sodass der Rezeptor permanent aktiv ist. Schema modifiziert nach Bennett M. et al. (2006) [16]

#### 2.2.2.2 *CALR*-Mutationen

Die zweithäufigste Driver-Mutation befindet sich im *CALR* Gen für das kodierende Protein Calreticulin im Exon 9. Diese wurde 2013 entdeckt und findet sich in 20% bis 25% der ET-Patienten [12]. Im klinischen Alltag spielen die zwei häufigsten Varianten von über 50 bekannten Frameshift Mutationen, eine Typ 1- (52-bp Deletion) und Typ 2 (5-bp Insertion-) Mutation, eine Rolle [18]. Das Protein Calreticulin ist hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytoplasma lokalisiert und erfüllt physiologisch drei Aufgaben: Im ER ist es als Chaperon zuständig für die Faltung von neusynthetisierten Proteinen und ist außerdem an der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase beteiligt. Im Zytoplasma beteiligt sich das Calreticulin an der Regulation von Genexpression und Zelladhäsion [19].

Kommt es zu einer Mutation im *CALR* Gen, führt dies zu einem neuen C-Terminus des Calreticulin Proteins (Abb. 3). Im Detail bedeutet dies, dass eine negativ-geladene Aminosäure durch eine neutrale oder positiv-geladene Aminosäure ersetzt wird [12]. Aufgrund des mutierten Calreticulin erfolgt über den MPL-Rezeptor eine Aktivierung des *JAK2* und *STAT* Signalweges ohne vorangegangene Ligandenbindung, was

letztlich in einer autonomen Proliferation und damit in einer Thrombozytose resultiert [18].

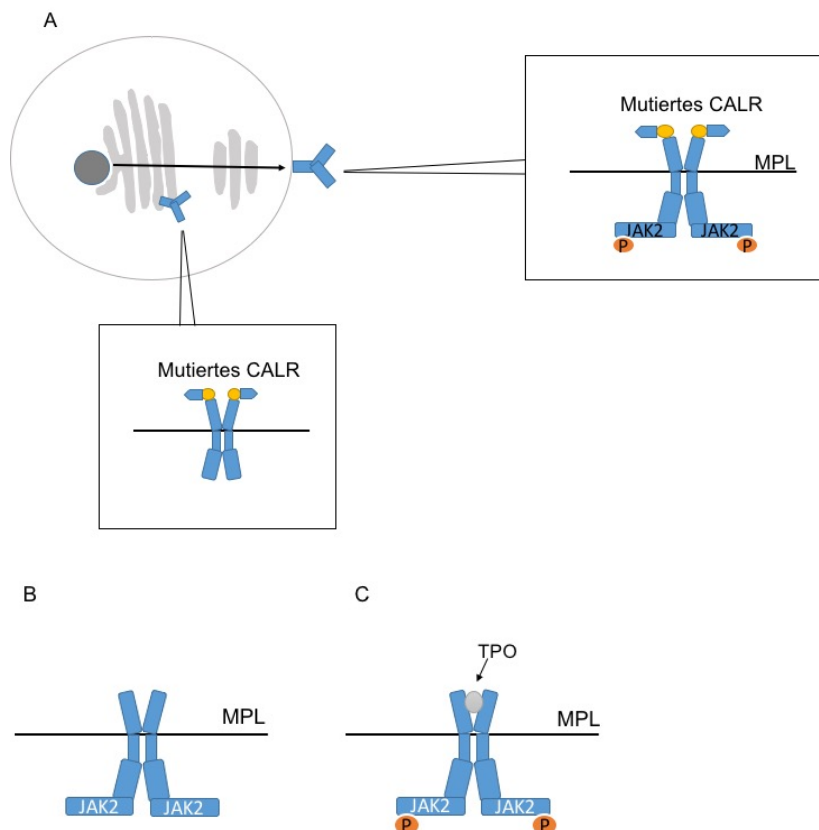


Abbildung 3: Signaltransduktion bei einer *CALR*-Mutation. (A) Aufgrund einer *CALR*-Mutation kommt es zu einer gestörten Interaktion zwischen dem mutierten Calreticulin im endoplasmatischen Retikulums und des TPO-Rezeptors (MPL). Die Folge davon ist eine permanente und TPO-unabhängige Aktivierung des TPO-Rezeptors über JAK2 Aktivierung. (B+C) Physiologischer TPO-Rezeptor. Im unmutierten Zustand ist der TPO-Rezeptor erst nach Ligandenbindung aktiviert. Schema modifiziert nach Cazzola M. et al (2016) [10]

### 2.2.2.3 *MPL*-Mutationen

An dritter Stelle ist die Driver- Mutation im *MPL* Gen im Exon 10 mit einer Häufigkeit von 4% bis 5% zu nennen. Dieses Gen kodiert für den Thrombopoietin Rezeptor (TPOR, *MPL*). Die häufigste Mutation ist *MPL* W515L, welche für die Aminosäure Tryptophan W515 in der amphiphatischen Domäne des *MPL* kodiert. Kommt es in dieser Domäne zu einer Mutation, führt dies zu einer Aktivierung des *MPL* unabhängig von der Anwesenheit von Thrombopoietin und damit zu einer unkontrollierten Thrombozytose [12, 20].

### 2.2.2.4 Weitere Mutationen

Darüber hinaus weisen circa 10% der ET-Patienten keine der drei Mutationen auf und werden daher auch als triple-negativ bezeichnet [3].

Die genetische Landschaft der MPN-assoziierten Mutationen reicht über die genannten drei Driver-Mutationen hinaus. Beispielsweise gehören dazu auch Mutationen in Genen, welche eine Rolle in der DNA-Methylierung spielen (*TET2*, *DNMT3A*), Transkriptionsfaktoren (TP53) oder Funktionen im RNA Splicing ausüben (*SRSF2*, *SF3B1*) [21-24].

Mit den Mutationen wurden Beziehungen zu dem Phänotyp beziehungsweise klinischen Outcome gestellt, die in folgender Tabelle dargestellt sind:

Tabelle 1: Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp, modifiziert nach Rumi, E. et al (2017) [3], [25]

Driver Mutation	Häufigkeit	Rezeptor	Klinik
<b>JAK2</b>	60%-65%	EPOR, MPL, G-CSFR	1. Erhöhtes Thromboserisiko 2. Möglicher Übergang in PV oder PMF
<b>CALR</b>	20%-25%	MPL, in geringen Maße G-CSFR	1. Niedrigeres Thromboserisiko 2. Höheres Progressionsrisiko in PMF
<b>MPL</b>	4%-5%	MPL	Höheres Progressionsrisiko in PMF
<b>Triple-negative</b>	10%		Niedriges vaskuläres Risiko

### 2.2.3 Klinik

Bei circa ein Drittel aller ET-Patienten verläuft die Erkrankung klinisch inapparent, die Patienten sind asymptomatisch [26].

Kommt es zur klinischen Ausprägung, dominieren zwei Symptome: Thrombosen und Blutungen.

#### 2.2.3.1 Thrombosen

Thrombosen werden allgemein als eine intravasale Bildung eines Blutgerinnsels, einem Thrombus definiert. Sie können sowohl im arteriellen als auch im venösen Gefäßsystem auftreten und zu lebensbedrohlichen Situationen führen.

Das Thromboserisiko ist bei ET-Patienten mit einer Inzidenz von 11% bis 25% erhöht [27].

Ein möglicher Erklärungsansatz für dies wäre, dass die Thrombozyten im Rahmen der ET eine Hyperfunktion aufweisen können. Barbui T. et al (2016) zeigte, dass bei *JAK2* V617F mutierten Patienten eine höhere Aktivität der Thrombozyten auf mehreren Signalwegen vorliegt [28].

Außerdem könnte die erhöhte Thromboseneigung durch die erhöhte Thrombozytenkonzentration im Blut erklärt werden, allerdings konnte bis heute noch kein kausaler Zusammenhang gestellt werden [29].

Zu den Thrombosen im arteriellen Stromgebiet zählen beispielsweise der akute Myokardinfarkt, der ischämische Apoplex sowie akute Verschlüsse einer Mesenterialarterie oder Extremitätenarterie. Arterielle Thrombosen treten häufiger auf und gehören zu den dominierenden Todesursachen [27]. Unter venösen Thrombosen beziehungsweise Thromboembolien bei Fortleitung des Thrombus versteht man Thrombosen im venösen Stromgebiet, am häufigsten sind hier die tiefe Beinvenenthrombose (TVT) und Lungenembolie zu nennen. Auffällig bei der ET ist, dass eine erhöhte Rate an intraabdominalen Venenthrombosen, wie der Portalvenen- und Lebervenenenthrombose, besteht [30].

#### 2.2.3.2 Blutungsneigung

Neben der Thrombophilie wird bei der ET auch eine erhöhte Blutungsneigung mit einer Inzidenz von 3,6% bis 37% beobachtet [27]. Diese hämorrhagische Diathese kann sich in Form von Petechien und Schleimhautblutungen wie Epistaxis, Zahnfleischblutungen und Menorrhagien manifestieren. Hämorrhagien im Gastrointestinaltrakt treten seltener auf, sind allerdings schwerwiegender und erfordern häufig eine Hospitalisation und Bluttransfusionen [31].

Die erhöhte Blutungsneigung wird überwiegend bei extrem hohen Thrombozytenkonzentrationen ( $>1000 \times 10^9/L$ ) beobachtet. Der genaue Pathomechanismus ist bislang unbekannt, wobei ein erworbener von-Willebrand-Defekt (erworbenes VWS) vermutet wird [27, 32, 33].

Darüber hinaus kann die Blutungstendenz analog zur Thromboseneigung aufgrund einer thrombozytären Unterfunktion zu erklären sein. In Assoziation mit der ET wurden

in der Vergangenheit bereits mehrere Dysfunktionen in der Antwort auf thrombozytäre Agonisten, Rezeptoren [34] und Signalwege [35] beschrieben.

#### 2.2.3.3 Weitere Symptome

Ein weiteres mögliches Symptom der ET sind Mikrozirkulationsstörungen (MZS). Dazu zählen Kopfschmerzen, Schwindel, Parästhesien und Erythromelalgie. Als Erythromelalgie bezeichnet man einen Zustand, bei dem es zu einem schmerzhaften Erythem und Überwärmung an den distalen Extremitäten kommen kann. Grund dafür ist die Thrombozytose [26].

Außerdem kann im späteren Verlauf eine Splenomegalie auftreten und in seltenen Fällen sich eine Post-ET-Myelofibrose entwickeln mit einer möglichen Progression in eine akute myeloische Leukämie (AML) [36].

#### 2.2.4 Diagnostik

Die ET zeichnet sich laborchemisch durch eine anhaltende Thrombozytenkonzentration von über  $450 \times 10^9/L$  aus. Zusätzlich kann es zu einer LDH-Erhöhung und Hyperurikämie aufgrund des erhöhten Zellumsatzes kommen. In der Knochenmarkzytologie und -histologie dominiert eine Proliferation von vergrößerten und reifen Megakaryozyten. Allerdings besteht eine normale Zelldichte ohne wesentliche Faservermehrung sowie keine Linksverschiebung der Granulo- und Erythropoese [3, 37].

2016 wurden von der WHO modifizierte Diagnosekriterien der ET veröffentlicht:

Tabelle 2: ET-WHO Diagnosekriterien von 2016, modifiziert nach Rumi, E. et al (2017) [3]

Hauptkriterien	Nebenkriterien
1. Thrombozytenzahl $>450 \times 10^9/L$	Nachweis einer genetischen Mutation oder Abwesenheit einer reaktiven Thrombozytose
2. ET-typische Knochenmarkbiospie mit vergrößerten und reifen Megakaryozyten	
3. Ausschluss von PV, PMF, CML, MDS und reaktiver Thrombozytose	
4. Nachweis einer <i>JAK2</i> , <i>CARL</i> oder <i>MPL</i> Mutation	

Die Diagnose ET erfolgt, wenn alle vier Hauptkriterien erfüllt sind oder die ersten drei Hauptkriterien und das Nebenkriterium zutrifft.

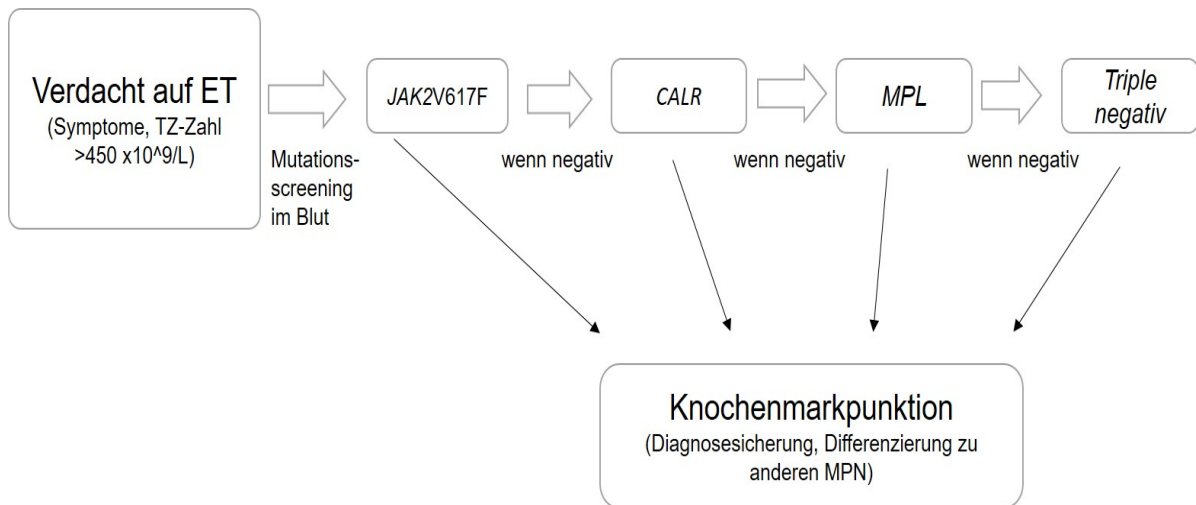


Abbildung 4: Diagnose Algorithmus ET. Schema modifiziert nach Tefferi A. et al (2015) [38]

### 2.2.5 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch zur ET stehen zwei Krankheitsbilder im Vordergrund.

Als erstes ist die reaktive, auch sekundär genannte, Thrombozytose zu nennen. Diese ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Thrombozytenproduktion bis zu  $1000 \times 10^9/L$  als Antwort auf verschiedene Reize. Dazu gehören zum Beispiel chronische oder systemische Infektionen, granulomatöse Erkrankungen, Traumata und größere Operationen, Eisenmangel oder paraneoplastisch im Rahmen einer malignen Grunderkrankung [26, 39, 40].

Eine Unterscheidung zwischen reaktiver und klonaler Thrombozytose gestaltet sich nicht immer einfach, da es keine definitiven Unterscheidungskriterien gibt. Allerdings zeigen Patienten mit reaktiver Thrombozytose häufig klare Symptome der verursachenden Grunderkrankung, die die erhöhte Thrombozytenkonzentration erklären kann. Als Entscheidungshilfe für eine reaktive Genese könnte hierbei beispielsweise erhöhte Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) dienen [39]. Darüber hinaus liegt bei einer reaktiven Thrombozytose keine *JAK2*-Mutation vor [41] und auch die erhöhte Thrombozytenkonzentration ist meistens nicht persistierend. Obwohl bei der sekundären Thrombozytose auch ein erhöhtes thromboembolisches Risiko besteht, liegt das Hauptaugenmerk auf die Behandlung der Grunderkrankung.

Die zweite wichtige Differentialdiagnose sind die anderen myeloproliferativen Erkrankungen wie die PV, PMF und CML. Die Differenzierung zwischen den MPN wird hauptsächlich über das histologische Erscheinungsbild ermöglicht.

#### 2.2.6 Therapie

Bis dato gibt es keine kurative und überlebensverlängernde Therapie der ET. Ziel der medikamentösen Therapie ist zum einen die Symptomkontrolle bei Vorhandensein von Beschwerden und zum anderen die Prävention von thromboembolischen Komplikationen. Da der individuelle Verlauf sehr unterschiedlich verlaufen kann, wurde als Entscheidungshilfe eine Risikostratifizierung mit begleitenden Therapieempfehlungen (Abb. 5) eingeführt. Nach der IWG-MRT (International Working Group- Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment) werden vier Patientengruppen unterschieden [42]:

1. sehr Niedrig-Risiko-Patienten
2. Niedrig-Risiko-Patienten
3. Intermediär-Risiko-Patienten
4. Hoch-Risiko-Patienten

Die Einteilung erfolgt aktuell nach Vorhandensein von Risikofaktoren für Thrombose [42]:

1. Alter über 60 Jahre (1 Punkt)
2. Thrombosenanamnese (2 Punkte)
3. Nachweis einer *JAK2/MPL* Mutation (2 Punkte)
4. kardiovaskuläre Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, 1 Punkt)

##### 2.2.6.1 Sehr Niedrig-Risiko-Patienten

Zu dieser Kategorie zählen Patienten, die keiner der drei Hauptrisikofaktoren aufweisen: Thrombosenanamnese, Alter über 60 Jahre und Nachweis der *JAK2*-Mutation. Sind außerdem keine kardiovaskulären Risikofaktoren vorhanden, können diese Patienten nach dem „watch and wait“-Prinzip behandelt werden. Dabei erhalten sie keine medikamentöse Therapie, allerdings werden die Patienten in regelmäßigen Abständen zur Kontrolle einbestellt, sodass man einen möglichen Progress frühzeitig erfassen und therapieren kann [42, 43].

Bei Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren wird eine Behandlung mit „low-dose“ Aspirin (ASS 100 mg) einmal täglich empfohlen, um das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen zu reduzieren.

#### 2.2.6.2 Niedrig-Risiko-Patienten

Als niedrig-Risiko-Patienten werden Patienten mit einer nachgewiesenen *JAK2*-Mutation klassifiziert. Therapieempfehlung hierbei ist „low-dose“ ASS einmal täglich beziehungsweise zweimal täglich bei Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren [42].

#### 2.2.6.3 Intermediär-Risiko-Patienten

Zu dieser Gruppe werden Patienten über 60 Jahre gerechnet. Diese sollten bei kardiovaskulärem Risiko zusätzlich zu „low-dose“ ASS einmal täglich eine Zytoreduktion mit Hydroxyurea (HU) erhalten. Ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren genügt eine Einnahme von „low-dose“ ASS einmal täglich [7].

#### 2.2.6.4 Hoch-Risiko-Patienten

Zu den Hoch-Risiko-Patienten gehören diejenigen, die entweder eine positive Thromboseanamnese aufweisen oder älter als 60 Jahre sind und eine *JAK2*-Mutation nachgewiesen worden ist. An dieser Stelle unterscheidet man zusätzlich, ob eine arterielle Thrombose oder eine venöse Thrombose stattgefunden hat. Bei einem arteriellen Ereignis wird eine Therapie mit „low-dose“ ASS zweimal täglich und bei einem venösen eine systemische Antikoagulation empfohlen. Unabhängig davon soll eine Zytoreduktion mit HU erfolgen [7].

Bei Intoleranz beziehungsweise HU refraktären Verlauf kann anstelle von HU Interferon-alpha oder Busulfan angewendet werden.

#### 2.2.6.5 Therapeutisches Management bei erworbenem VWS

Bei der Therapie der ET ist besonders bei extremer Thrombozytose Vorsicht geboten. Da es dabei aufgrund eines vermuteten erworbenen von-Willebrand-Syndroms (VWS) bereits ohne Therapie zu einer verstärkten Blutungsneigung kommt, wäre eine

zusätzliche Thrombozytenhemmung über eine Gabe von ASS kontraproduktiv und würde die Blutungssituation verschlimmern [7].

Therapeutisches Prinzip hierbei ist eine Reduktion der Thrombozytenkonzentration. Dies wird üblicherweise über HU oder einer Thrombozytenapharese erreicht, wobei letztere in Notfallsituationen indiziert ist [27].

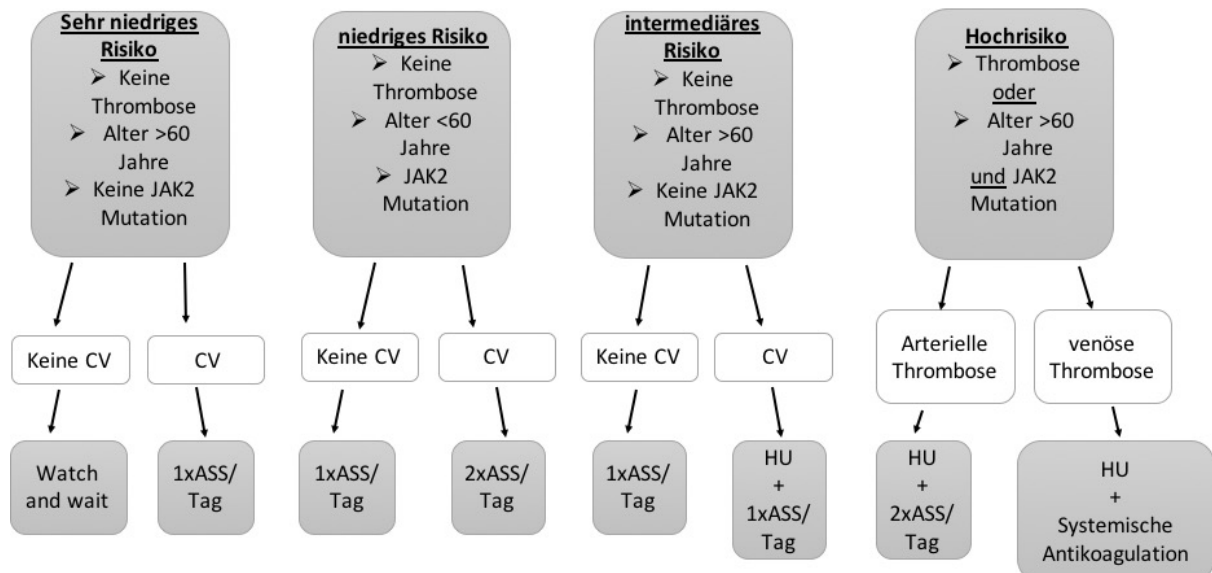


Abbildung 5: Therapiealgorithmus modifiziert nach Tefferi A. et al (2019) [7]

## 2.2.6.6 Eingesetzte Substanzen

### 2.2.6.6.1 Aspirin (ASS)

Seitdem 1975 Roth et al. entdeckte, dass Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) die Thromboxan A<sub>2</sub> vermittelte Plättchenaktivierung inhibiert, ist ASS der weltweit am häufigsten verwendete Thrombozytenfunktionshemmer und gilt bislang als Goldstandard zur sekundären Prävention von arteriellen Thrombosen [44],[45]. Der Wirkmechanismus der Plättchenhemmung beruht auf einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase (COX) 1. Physiologisch katalysiert die COX 1 die Synthese von Prostaglandin H<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure. Das Eicosanoid Thromboxan A<sub>2</sub> wiederum spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation. Ist dies nicht mehr vorhanden, ist auch die Thrombozytenfunktion partiell gehemmt [46, 47].

Eine suffiziente Thrombozytenhemmung hält für sieben bis elf Tagen an und erfolgt bereits in niedriger Dosierung („low-dose“ ASS), weshalb im klinischen Alltag zu dieser Indikation eine tägliche Einnahme von 100 mg Praxis ist [48].

Aufgrund des erhöhten Thromboserisiko ist „low-dose“ ASS in allen Risikogruppen bis auf die Sehr-Niedrig-Risiko-Gruppe ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren indiziert [7, 49]. Darüber hinaus zeigte Koudstaal P.J. et al (1997) in seiner Arbeit, dass ASS eine zufriedenstellende Symptomkontrolle bei Mikrozirkulationsstörungen erreichen kann [50].

Die wichtigste mögliche unerwünschte Wirkung ist eine verlängerte Blutungszeit durch Hemmung der primären Hämostase. Da die Wirkung von ASS irreversibel ist und es bislang kein Antidot gibt, kann eine unkontrollierte notfallmäßige Blutung nur durch die Gabe von Thrombozytenkonzentraten aufgehoben werden.

Weitere Nebenwirkungen sind die ASS-Unverträglichkeit und das Reye-Syndrom, einer ASS-assoziierten Leberfunktionsstörung und Enzephalopathie bei Kindern, weshalb eine Einnahme von ASS bei Kindern kontraindiziert ist [51].

Darüber hinaus sollte ASS bei extremer Thrombozytose mit Vorsicht gegeben werden, da wie oben bereits beschrieben, es aufgrund eines erworbenen VWS zu einer verstärkten Blutungsneigung kommen kann [7].

#### 2.2.6.6.2 Hydroxyurea (HU)

Hydroxyurea (HU), auch bekannt unter Hydroxyharnstoff und Hydroxycarbamid, gilt als Erstlinienmedikament zur Zytoreduktion bei ET-Hochrisiko-Patienten. Der pharmakodynamische Mechanismus beruht auf einer Inhibition der Ribonukleotidreduktase, wodurch die Reduktion der Nukleotide nicht mehr erfolgen kann und damit die DNA-Synthese gehemmt wird [52].

Ziel der Zytoreduktion ist eine Verringerung der Thrombozytenkonzentration unter  $450 \times 10^9/L$  und damit einer Reduktion des Thrombose- und Blutungsrisiko bei Hochrisiko-Patienten [53]. In der Arbeit von Cortelazzo S. et al wurde gezeigt, dass HU (9%) im Vergleich zu keiner Therapie (45%) signifikant das Auftreten von Thrombosen verringert [54]. Im Gegensatz dazu wird das Thromboserisiko in asymptomatischen Niedrig-Risiko-Patienten als nicht hoch genug angesehen, um eine potentiell mutagene oder toxische Therapie zu rechtfertigen [27].

Zu den potentiellen unerwünschten Wirkungen zählen wie bei fast allen Zytostatika eine Knochenmarkdepression mit Anämie und Neutropenie. Außerdem können

gastrointestinale Beschwerden auftreten und dermatologisch kann es zu schmerzhaften Hautulzerationen und Aphthen kommen [55].

Darüber hinaus wird eine mögliche Kanzerogenität in Form von leukämischen Transformationen und Hauttumoren beschrieben [55]. Aufgrund dieser potentiellen teratogenen Wirkungen ist HU in der Schwangerschaft kontraindiziert und sollte bei jungen Frauen mit großer Vorsicht angewendet werden [27, 56].

HU gilt aufgrund seiner hohen Wirksamkeit als Mittel der ersten Wahl. Jedoch wird eine HU Intoleranz beziehungsweise Resistenz von ungefähr 20% angegeben [57]. In solchen Fällen werden auf die Zweitlinien Therapie zurückgegriffen.

#### 2.2.6.6.3 Zweitlinien Therapie

Heutzutage stehen mehrere weitere Therapieansätze der ET zur Verfügung. Jedoch wurde ihre Überlegenheit gegenüber der Erstlinien Therapie bis dato nicht bewiesen, weshalb sie erst bei Therapieversagen angewendet werden.

##### 2.2.6.6.3.1 Interferon- $\alpha$

Interferone gehören zu der Gruppe der körpereigenen Zytokine und wirken immunmodulatorisch, antiviral und antiproliferativ auf den menschlichen Organismus. In der Behandlung der ET nutzt man den vermuteten suppressiven Effekt von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) auf die hämatopoetische Stammzelle zu Nutze, was zu einer Zytoreduktion der erhöhten Thrombozytenkonzentration führt [58].

Im Gegensatz zu HU werden dem IFN- $\alpha$  keine teratogenen Effekte zugeschrieben. Daher wird IFN- $\alpha$  als Alternative zu HU bei jungen Patienten, insbesondere jungen Frauen mit Kinderwunsch, empfohlen. Obwohl keine mutagenen Wirkungen beziehungsweise eine Plazentagängigkeit in der Therapie mit IFN- $\alpha$  bekannt sind, sollte bei Schwangeren dennoch eine strenge Indikation erfolgen [59].

Der große Nachteil in der Anwendung mit IFN- $\alpha$  besteht in der hohen Nebenwirkungsrate, weshalb es nicht in der Erstlinientherapie angewendet wird. Häufig beschriebene Nebenwirkungen sind grippeähnliche Symptome mit Fieber, Myalgien und Cephalgien und Leukozytopenien. Zu den neurotoxischen Wirkungen gehören Störungen der Konzentrationsfähigkeit, Depressionen, Verwirrtheit und Schwindel. Außerdem können gastrointestinale Beschwerden und eine hepatische

Reaktion mit Erhöhung der  $\gamma$ -GT und des Bilirubins auftreten. Aufgrund dieser starken unerwünschten Effekte von IFN- $\alpha$  kommt es häufig zu einem Therapieabbruch [1].

#### 2.2.6.6.3.2 Anagrelid

Anagrelid gehört zu der Substanzgruppe der Imidazoquinazoline und bewirkt eine gezielte Reduktion der Thrombozytose ohne Effekte auf die anderen Blutzellreihen. Dies erfolgt über die Inhibition der Reifung der Megakaryozyten [27] über Veränderungen in der Genexpression (Inhibition der Transkriptionsfaktoren GATA-1 und FOG-1) [60]. Eine anti-thrombozytäre Wirkung zeigt Anagrelid nur in einer höheren Dosierung als der therapeutischen Dosis über die Inhibition der cAMP-abhängigen Phosphodiesterase III (cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase) in den Thrombozyten [41, 60].

Wie auch das IFN- $\alpha$  kommt es bei der Anwendung von Anagrelid zu häufigen Nebenwirkungen. Bei bis zu 50% der Patienten treten Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhö auf, die allerdings häufig im Verlauf sistieren beziehungsweise mit Analgetika gut in den Griff zu bekommen sind. Aufgrund von Inotropie-steigernden Effekte (Hemmung der cAMP) kann es zu Palpitationen und Herzrasen kommen, weshalb Anagrelid bei bekannter kardialer Vorgeschichte wie Herzinsuffizienz nicht angewendet werden soll. Darüber hinaus geben Patienten eine vermehrte Flüssigkeitsretention mit Ödembildung an. Es wird vermutet, dass dies auf vasodilatative Effekte zurückzuführen ist [41].

Obwohl Anagrelid keine mutagene Wirkung aufzeigt, sollte es dennoch nur unter strenger Indikation in der Schwangerschaft angewendet werden.

Die Frage, ob Anagrelid mit dem insgesamt tendenziell günstigeren Nebenwirkungsprofil einer Therapie mit HU vorzuziehen ist, wurde bislang kontrovers diskutiert. In einer Studie von Harrison C. et al wurde gezeigt, dass mit Anagrelid eine erhöhte Rate an arteriellen Thrombosen und schweren Hämorrhagien beobachtet wurde [61]. In einer aktuelleren Studie, der ANAHYDRET Studie, veranschaulicht Gisslinger H. et al im Gegensatz dazu, dass Anagrelid dem HU nicht unterlegen ist in Bezug auf eine Prävention von thromboembolischen Ereignissen [62]. Aus diesem Grund wäre Anagrelid als Alternative zum HU zu erwägen und müsste individuell evaluiert werden (je nach Nebenwirkungsprofil).

#### 2.2.6.6.3.3 Busulfan

Busulfan, ein zu den Alkylantien gehörendes Zytostatikum wurde aufgrund einer früheren Assoziation zu sekundären Neoplasien und leukämischen Transformationen selten angewendet. In der Studie von Renso R. et al wurde allerdings gezeigt, dass die Gabe von Busulfan in niedriger Dosierung sicher und effektiv ist und daher weiterhin bei HU-intoleranten ET-Patienten gegeben werden kann [63].

#### 2.2.6.6.3.4 Ruxolitinib

Die Entdeckung der *JAK2* V617 Mutation stellte einen Meilenstein im Verständnis der myeloproliferativen Erkrankungen dar. Mit der Entwicklung des JAK1/JAK2 Inhibitors Ruxolitinib versprach man sich ebenfalls große Erfolge. In der MAJIC-ET-Studie von Finazzi G. et al wurde jedoch gezeigt, dass Ruxolitinib im Vergleich zur Erstlinien Empfehlung keine Verbesserung der Therapie erbringt [36]. Weitere Studien und Ergebnisse zu der Anwendung von Ruxolitinib werden in Zukunft noch erwartet. Bis dahin bleiben die bisherigen Indikationen für Ruxolitinib neben dem Versagen der Erstlinientherapie auch die Progression in eine Post-ET-Myelofibrose [1].

#### 2.2.6.6.3.5 Thrombozyten-Apherese

Die externe Trennung der Blutplättchen vom Blut ist eine effektive Methode, um in kürzester Zeit eine zu hohe Thrombozytenkonzentration zu reduzieren. Dieses Verfahren wird in Notfallsituationen von lebensbedrohlichen Blutungen, wie beispielsweise bei einem erworbenen VWS, angewendet. Als permanente Therapie ist dieser Ansatz allerdings nicht empfohlen, da der therapeutische Effekt in der Regel nur von kurzer Dauer ist [59, 64].

Tabelle 3: Übersicht der am häufigsten eingesetzten Substanzen bei ET

	Target	UAW	Kontraindikation
<b>Aspirin</b> (1 <sup>st</sup> line)	Thrombozytenaggregations- hemmung über COX		Erhöhte Blutungsneigung, extreme Thrombozytose
<b>Hydroxyurea</b> (1 <sup>st</sup> line)	Zytoreduktion durch Hemmung der Ribonukleotidreduktase	Knochenmarkdepression, fragliche Kanzerognität (akute Leukämie, Hauttumoren), Gastrointestinale Beschwerden, Hautausschläge	Schwangerschaft
<b>Anagrelid</b> (2 <sup>nd</sup> line)	Selektive Hemmung der Megakaryopoese	Kopfschmerzen, Palpitationen, Flüssigkeitsretention	Schwangerschaft, kardiale Vorerkrankungen
<b>Interferon- alpha</b> (2 <sup>nd</sup> line)	Zytoreduktion durch Hemmung der Hämatopoese	Knochenmarkdepression, Leberenzymerrhöhung, grippeartige Symptome, Depression	Dekompensierte Leberinsuffizienz, psychische Erkrankungen

#### 2.2.6.7 therapeutisches Ansprechen

Um einen möglichen Therapieerfolg zu evaluieren, entwickelte die Internationale Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) im Jahr 2013 Kriterien für ein Therapieansprechen (Remission) anhand von klinischen, laborchemischen und molekulargenetischen Parametern [65]. Dabei gilt es, eine komplette Remission von einer partiellen Remission zu unterscheiden. Letztere weist im Gegensatz zur kompletten Remission keine histologische Normalisierung, also eine Persistenz von abnormalen Megakaryozyten (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Kriterien der kompletten und partiellen Remission.

	Komplette Remission	Partielle Remission
<b>A</b>	Dauerhafte* Regredienz von krankheitsbedingten Symptomen, inklusive tastbare Hepatosplenomegalie UND	Dauerhafte* Regredienz von krankheitsbedingten Symptomen, inklusive tastbare Hepatosplenomegalie UND

<b>B</b>	Dauerhafte Normalisierung des peripheren Blutbildes (Thrombozyten-Konzentration $\leq 400 \times 10^9/L$ , Leukozyten-Konzentration $<10 \times 10^9/L$ , Abwesenheit von Blasten UND	Dauerhafte Normalisierung des peripheren Blutbildes (Thrombozyten-Konzentration $\leq 400 \times 10^9/L$ , Leukozyten-Konzentration $<10 \times 10^9/L$ , Abwesenheit von Blasten UND
<b>C</b>	Keine Zeichen einer Krankheitsprogression, kein Auftreten von hämorrhagischen oder thrombotischen Ereignissen UND	Keine Zeichen einer Krankheitsprogression, kein Auftreten von hämorrhagischen oder thrombotischen Ereignissen UND
<b>D</b>	Nachweis einer histologischen Remission im Knochenmarkpunktat, definiert als Fehlen von abnormalen Megakaryozyten und Fehlen von $>$ Grad 1 Fibrose	<u>Keine</u> histologische Remission im Knochenmarkpunktat, definiert als Persistenz von abnormalen Megakaryozyten

\* Mindestdauer 12 Wochen. Schema modifiziert nach Barosi G. et al (2013) [65].

### 2.2.6.8 Prognose und Ausblick

Mit einer medianen Überlebenszeit von 20 Jahren, beziehungsweise für jüngere Patienten von 33 Jahren, zählt die essentielle Thrombozythämie zu den MPN mit den günstigeren Prognosen [66]. Jedoch ist die Lebenserwartung von ET-Patienten geringer als die der Normalbevölkerung [7]. Zu den häufigsten Todesursachen gehören die thromboembolischen Komplikationen. In seltenen Fällen (circa 5%) kommt es zu einer Transformation in eine Post-ET-Myelofibrose oder eine akute Leukämie [38].

Bis heute stellt man sich der Herausforderung, neue und individuelle Parameter für ET-Patienten mit hohem Thrombosierisiko zu identifizieren. Die heutige Forschung richtet sich nach der Identifizierung von prognostischen Biomarkern und Entwicklung von krankheitsbeeinflussenden Wirkstoffen, um so eine Optimierung von Zeitpunkt und Art der Therapie erreichen zu können.

## 2.3 Humane Thrombozyten

### 2.3.1 Anatomie der Thrombozyten

Mit einem Durchmesser von 2 bis 5  $\mu\text{m}$  sind die im Jahre 1882 von Giulio Bizzozero entdeckten Thrombozyten (Blutplättchen) als diskoide und kernlose Abschnürungen der Megakaryozyten die kleinsten Blutzellen im menschlichen Organismus [67],[68]. Die Bildung der Thrombozyten unterliegt einer strengen Regulierung im Knochenmark

und nach neueren Erkenntnissen auch in der Lunge [69]. Im Blutkreislauf zirkulieren ungefähr  $150-350 \times 10^9/L$  Thrombozyten. Täglich werden circa  $1 \times 10^{11}$  Thrombozyten produziert und nach einer Lebensdauer von acht bis zwölf Tagen werden sie in der Milz abgebaut [40].

Charakteristisch für die Thrombozyten sind zum einen eine Reihe an spezifischen Rezeptoren auf ihrer Membran, die essentiell für Signaltransduktion sind. Andererseits finden sich in ihrem Zytoplasma drei Granula-Typen:  $\alpha$ -Granula, elektronendichte (dense) Granula und  $\lambda$ -Granula (Lysosomen). Die  $\alpha$ -Granula enthalten neben wichtigen Mediatoren der Hämostase in Form von Adhäsionsproteinen und Gerinnungsfaktoren auch proinflammatorische und antibakterielle Substanzen [70].

Tabelle 5: Übersicht der thrombozytären Granula und ihre Inhaltsstoffe, modifiziert nach Jurk et al. [70],

	<b>Granulainhalt</b>	<b>Funktion</b>
<b><math>\alpha</math>-Granula (50-80/Thrombozyt)</b>	vWF, TSP-1, Fibrinogen, Fibronektin PF4	TZ-Adhäsion, TZ-Aktivierung, TZ-Aggregation
	Faktor V, VII, XI, XIII	Thrombingenerierung
	Plasminogen, Protein C+S	Inhibitoren der Hämostase
	Immunglobulin A, G, M, Komplementfaktoren	Immunabwehr
	mitogene Faktoren (PDGF, VEGF)	Zellproliferation
<b><math>\delta</math>-(dense)-Granula (3-8/Thrombozyt)</b>	ADP, ATP TxA <sub>2</sub> , Serotonin, Ca <sup>2+</sup> Polyphosphate	TZ-Aktivierung, TZ-Aggregation, Granulasekretion
<b><math>\lambda</math>- Granula (Lysosomen) (0-3/Thrombozyt)</b>	Collagenase, Elastase Cathepsin D, E	Immunabwehr

### 2.3.2 Thrombozyten und Hämostase

Unter der Hämostase, der Blutgerinnung, versteht man die Bildung eines stabilen Thrombus, wodurch unter physiologischen Bedingungen ein Verschluss einer Gefäßverletzung ermöglicht wird. Dabei wird traditionell in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. Im Rahmen einer Gefäßverletzung erfolgt in der primären

Hämostase eine Rekrutierung von Thrombozyten und der ersten Abdeckung der Verletzung. Anschließend werden in der sekundären Hämostase diese Thrombozyten mithilfe von Fibrin vernetzt und verklebt, sodass ein effektiver Wundverschluss entsteht.

Während nach früheren Ansichten den Thrombozyten nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wurde, werden sie heutzutage als Hauptakteure der primären als auch sekundären Hämostase verstanden [71, 72].

### 2.3.2.1 Thrombozytenaktivierung in der primären Hämostase

Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßwand, versammeln sich in kürzester Zeit Thrombozyten am freigelegten Subendothel und eine Kaskade der Blutgerinnung wird schlagartig in Gang gesetzt (Abb. 6) [73].

#### 2.3.2.1.1 Thrombozytenadhäsion

Am Ort der Verletzung werden Teile der subendothelialen Matrix, wie zum Beispiel der von Willebrand Faktor (VWF), Kollagen und Thrombospondin 1 (TSP-1), freigelegt. Treten diese Strukturen mit den Thrombozyten in Kontakt, werden diese über die Membranrezeptoren am Endothel angeheftet [74, 75].

Handelt es sich dabei um ein Gefäß im arteriellen Stromgebiet, wo starke Scherkräfte herrschen, müssen die Thrombozyten zunächst eingefangen werden. Dies erfolgt hauptsächlich über das multimere Adhäsionsprotein von VWF, der unter hohen Scherkräften repetitive Bindungsdomänen für die Thrombozyten aufweist [73]. Diese binden über das Glykoprotein (GP)  $Ib\alpha$ , welches Teil des Plättchenrezeptors GPIb/V/IX-Komplex ist, an die Thrombozyten [76]. Dadurch werden diese fest an der Gefäßwand verankert und werden nicht durch die Strömung wieder losgerissen.

Ebenso kann eine Thrombozytenadhäsion über TSP-1 am GPIb/V/IX-Komplex erreicht werden [75].

Im Gegensatz dazu können die Thrombozyten unter venösen Strömungsbedingungen zusätzlich direkt an das freigelegte Kollagen der Gefäßwand binden. Diese Adhäsion wird über den GP-VI und das Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (GPIa/IIa) vermittelt [71].

### 2.3.2.1.2 Thrombozytäre Granulasekretion

Der initiale Adhäsionsprozess bewirkt eine zeitgleiche Aktivierung der Thrombozyten in Form von einer Freisetzung des Granulainhaltes der Plättchen. Die von den „dense bodies“ ( $\delta$ -Granula) ausgeschütteten Substrate, wie das Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A<sub>2</sub> und Serotonin, können als lösliche Agonisten an spezifische Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran binden [77]. Im Rahmen eines Feedback-Mechanismus aktivieren diese autokrin denselben Thrombozyten, wodurch die Aktivierung verstärkt wird. Außerdem können sie zusätzlich weitere Thrombozyten rekrutieren und aktivieren. Im Detail werden diese Aktivierungsmechanismen im Kapitel 2.3.2 Signalwege der Thrombozyten erläutert.

Zusätzlich werden Calcium Ionen in das Zytoplasma der Thrombozyten freigesetzt. Diese tragen als „second messenger“-Mediatoren zu einer weiteren Granulasekretion bei und ermöglichen als essentieller Bestandteil einer Muskelkontraktion eine Zytoskelettkontraktion mit Pseudopodienbildung und damit eine Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten [78].

Darüber hinaus kommt es zu einer Translokation von spezifischen Oberflächenrezeptoren auf die Membran der Thrombozyten. Beispielsweise findet sich nach der Aktivierung eine vermehrte Anzahl an  $\alpha$ -granulärem Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P) auf der thrombozytären Oberfläche, welche als Aktivierungsmarker gilt und die Bindung an neutrophile Granulozyten und Monozyten vermittelt [79].

### 2.3.2.1.3 Thrombozytenaggregation

Für die Bildung von Thrombozytenaggregaten ist das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oder GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche essentiell. Erst nach einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa durch eine Aktivierung der Thrombozyten über einen Agonisten wie Kollagen oder Thrombin, können lösliche Liganden wie das Fibrinogen an GPIIb/IIIa binden. Dadurch bilden sich Fibrinogenbrücken zwischen den Plättchen aus, wodurch diese zusammengehalten werden und damit zur Thrombozytenaggregation führen [73, 80].

Neben dem Fibrinogen können auch andere Liganden an den Rezeptor binden, wie beispielsweise VWF, Fibronektin und TSP-1 [78].

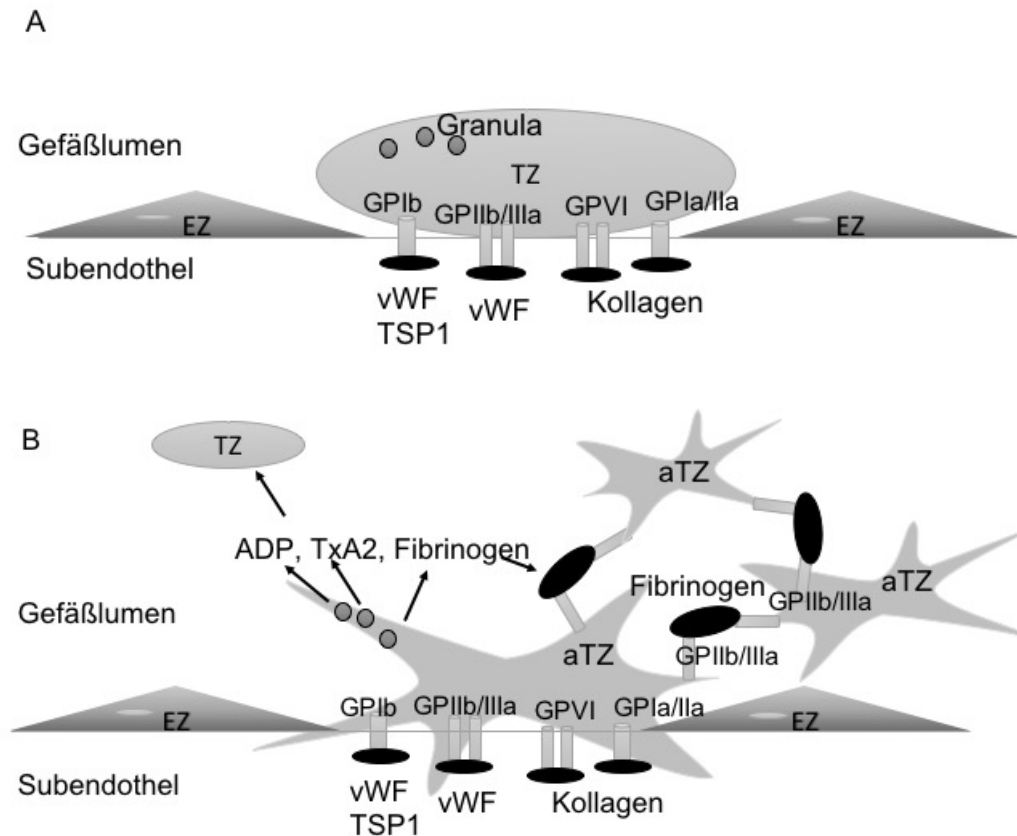


Abbildung 6: Primäre Hämostase.

(A) Adhäsion. Thrombozyten werden am verletzten Endothel über vWF und TSP1 via GPIb/VI/IX und über Kollagen via GPVI/IIb/IIIa eingefangen. (B) Granulasekretion und Aggregation. Aktivierte Thrombozyten schütten ihre Granula aus und locken dabei weitere Thrombozyten an. Über aktiviertes GPIIb/IIIa werden Fibrinogenbrücken zwischen mehreren Thrombozyten ausgebildet. Modifiziert nach Jurk K. et al (2008) [71]. Abkürzungen: TZ: Thrombozyt, aTZ: aktivierter Thrombozyt, EZ: Endothelzelle, vWF: von Willebrand Faktor, TSP1: Thrombospondin 1, GP: Glykoprotein, TxA<sub>2</sub>, Thromboxan A<sub>2</sub>.

### 2.3.2.2 Thrombozyten in der sekundären Hämostase

Die zuvor abgelaufenen verschiedenen Aktivierungsmechanismen dienen der Vorbereitung der Zusammenlagerung der Thrombozyten mit den Gerinnungsfaktoren. Für die Bildung eines festen und stabilen Wundverschluss bedarf es einer Verfestigung der zuvor zusammengeführten Thrombozytenaggregate. Dies erfolgt über eine explosionsartige Generierung von Thrombin aus Prothrombin, dem sogenannten „thrombin burst“ auf der Oberfläche der Thrombozyten [71]. Die initiale Thrombinbildung über TF-tragenden Zellen hat eine Anordnung über spezifische Rezeptoren von Gerinnungsfaktoren, Xase-Komplexen und Prothrombinase-Komplexen auf der Thrombozytenoberfläche bewirkt [70]. Dies ermöglicht eine optimale Zusammenlagerung der Gerinnungskomplexe und der Bildung von Faktor Xa, sodass dadurch eine Effizienzsteigerung von über das  $2 \times 10^8$ -fache erreicht wird

[81]. Aufgrund dieser Steigerung kommt es zu einer massiven Bildung von Thrombin durch die Spaltung von Prothrombin und damit einer Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Diese große Menge an Fibrin ist für die Bildung eines stabilen Fibrinnetzes ausreichend und sorgt über eine effiziente Verfestigung der Thrombozytenaggregate zu einem erfolgreichen Wundverschluss.

### 2.3.2.3 Signalwege der Thrombozyten

#### 2.3.2.3.1 Aktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

GPCR sind Transmembranproteine und interagieren über ihren zytoplasmatischen Bereich mit heterotrimeren G-Proteinen [82]. Bindet ein Agonist an einen GPCR, wird eine Signaltransduktionskaskade ins Zellinnere ausgelöst. Dabei werden drei Untergruppen an GPCR unterschieden:  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren mit einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC),  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren mit einer Inhibition der Adenylatcyclase und  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren, die über eine Aktivierung der Phospholipase C-beta (PLC-beta) wirken. Mehrere thrombozytäre Agonisten, wie das ADP, Thromboxan A2 und Thrombin, bewirken über eine Bindung an  $G_q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren eine Aktivierung der Plättchen durch eine  $Ca^{2+}$ -Ionen Freisetzung und Granulasekretion (Abb. 7) [83].

##### 2.3.2.3.1.1 Agonist Adenosindiphosphat (ADP)

Auf der Thrombozytenoberfläche sind zwei Purinorezeptoren für ADP lokalisiert:  $P2Y_1$  ( $G_q$ -Protein gekoppelt) und  $P2Y_{12}$  ( $G_i$ -Protein gekoppelt). Bei Bindung an den Rezeptor  $P2Y_1$  wird eine transiente Thrombozytenaktivierung hervorgerufen. Bindet ADP zusätzlich an den  $P2Y_{12}$  Rezeptor, bewirkt dies eine manifeste Aktivierung [84]. Diese zeigt sich in Form einer intrazellulären  $Ca^{2+}$  Mobilisierung, einer Formänderung der Thrombozyten und es wird bereits eine irreversible Thrombozytenaggregation induziert.

Darüber hinaus kann ADP als ein positiver Feedback-Aktivator angesehen werden, da bei einer Abwesenheit des  $P2Y_{12}$ -Rezeptors eine reduzierte Thrombozytenaktivierung in niedrigen Konzentrationen von anderen Agonisten wie Kollagen und Thrombin beobachtet wurde [85].

#### 2.3.2.3.1.2 Agonist Thromboxan A<sub>2</sub>

Im Rahmen der Plättchenaktivierung kommt es über Calcium-Ionen vermittelt und über die Cyclooxygenase 1 (COX-1) katalysiert zu einer Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) aus Arachidonsäure im Zytoplasma des Thrombozyten. Als positiver Feedback Agonist bewirkt dieses freigesetzte TxA<sub>2</sub> über den TP-Rezeptor wie auch die anderen GPCR Agonisten eine Aktivierung der Thrombozyten [86]

#### 2.3.2.3.1.3 Agonist Serotonin

Neben seinen Funktionen als Neurotransmitter und Vasokonstriktor wird Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) ebenfalls aus den elektronendichten Granula freigesetzt. Über den GPCR 5HT<sub>2A</sub> bewirkt es eine Stimulation der Thrombozyten. Außerdem bewirkt Serotonin mithilfe einer Transglutaminase (Serotonylierung) eine kovalente und damit eine sehr stabile Bindung von  $\alpha$ -granulären Proteinen wie zum Beispiel Fibrinogen, VWF, TSP-1 und Faktor V auf der thrombozytären Oberfläche [87, 88].

#### 2.3.2.3.1.4 Agonist Thrombin

Die Serinprotease Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin und gilt als einer der stärksten Thrombozytenaktivatoren [89]. Auf der Oberfläche von TF-tragenden Zellen wird Thrombin aus seiner Vorstufe Prothrombin in Anwesenheit von Faktor Xa gebildet. Dieses generierte Thrombin kann über die „protease-activated Rezeptoren“ 1 und 4 (PAR-1 und PAR-4) an humane Thrombozyten binden und bewirkt G<sub>q</sub>-Protein gekoppelt eine Aktivierung des Thrombozyten [90]. Darunter zählt neben einer Aktivierung des GPIIb/IIIa auch die Bildung von TxA<sub>2</sub> und die Sekretion der Granulainhalte [89].

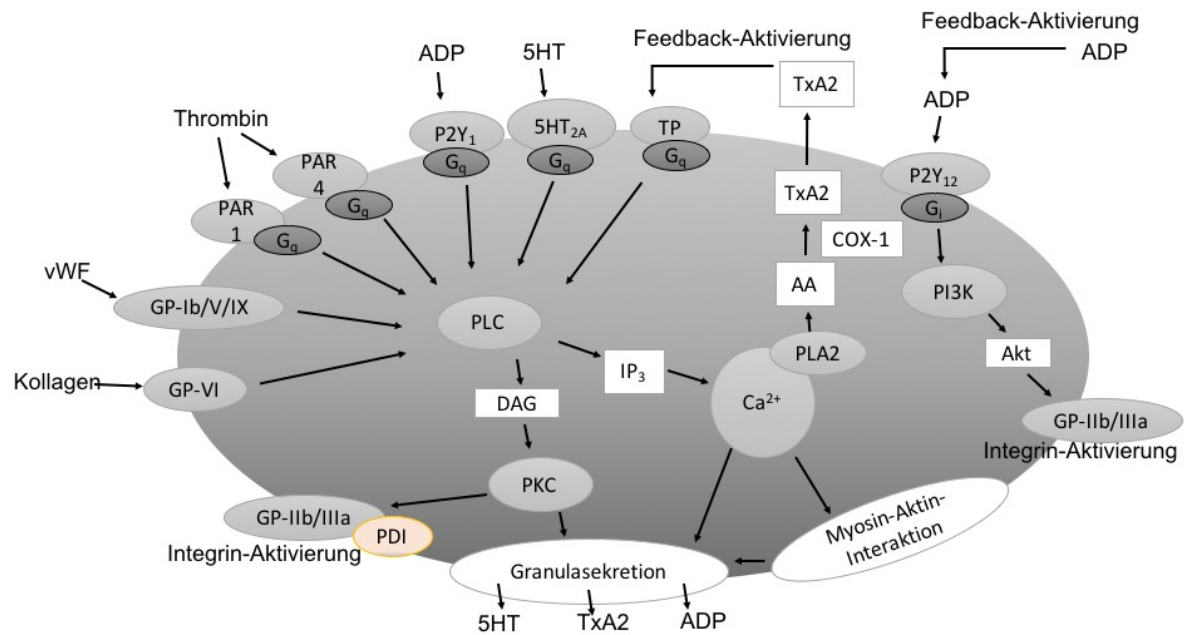


Abbildung 7: Übersicht der thrombozytären Signaltransduktionswege, modifiziert nach Jurk K. (2015) [88], [91] Abkürzungen: vWF: von Willebrand Faktor, PAR: „protease-activated receptor“, GP: Glykoprotein, PLC: Phospholipase C, DAG: Diacylglycerin, IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat, PKC: Proteinkinase C; TxA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>, TP: Thromboxan Rezeptor, AA: Arachnoidonsäure, COX-1: Cyclooxygenase 1, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, Akt: Proteinkinase B, PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A 2, PDI: Proteinindisulfidomerase, 5HT: 5-Hydroxytyramin; Serotonin.

### 2.3.2.3.2 Aktivierung über Kollagen

Ein wichtiger Schritt der Thrombozytenaktivierung erfolgt über Kollagen und dessen Hauptsignalrezeptor GPVI. Eine Kollagenfibrille besitzt mehrere Bindungsstellen für GPVI, wodurch die Rezeptoren in der Thrombozytenmembran „geclustert“ beziehungsweise quervernetzt werden. Zusätzlich ist das GPVI mit einer Fc Rezeptor  $\gamma$  Kette (FcR $\gamma$ ) nicht kovalent verbunden, welches ein sogenanntes „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM-) enthaltene Signalprotein ist [92, 93]. Durch eine Bindung von Kollagen an den GPVI/Fc $\gamma$ -Komplex wird über eine Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) eine sogenannte „Outside-in-Aktivierung“ initiiert, das heißt, dass eine Aktivierung von einem Liganden in die Zelle hinein erfolgt [73, 88]. Dies geschieht in Form von einer Dimerisierung des GPVI Rezeptors, was eine Phosphorylierung der FcR $\gamma$  ITAM Kette zur Folge hat [94]. Dadurch wiederum kommt es zu einer Aktivierung aus der Zelle nach außen, analog wird dies als „inside-out-Signaling“ bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung von den Transmembranproteinen, den Integrinen, der Thrombozyten. Diese Konformationsänderung ist ein entscheidender Schritt in der Thrombozytenaktivierung, da dieser die Bindung von dem Integrin GPIIb/IIIa an dem löslichen Plasmaprotein Fibrinogen ermöglicht [73]. Fibrinogen seinerseits kann an

zwei GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf verschiedenen Thrombozyten binden, wodurch es nicht nur zu einer Quervernetzung der Thrombozyten, sondern auch zu einer weiteren Rekrutierung von Thrombozyten kommt. Die daraus resultierende großflächige Abdeckung bildet den Grundstein der folgenden Aggregation. Ein aktiviertes GPIIb/IIIa führt außerdem zu einem Formwandel mit Pseudopodienbildung und damit zu einer Ausbreitung des Thrombozyten, was die Wundabdeckung weiter unterstützt.

Neben der Aktivierung des Integrin GPIIb/IIIa bewirkt die Konformationsänderung zudem eine verbesserte Bindungsfähigkeit des Integrins GPIa/IIa an Kollagen, was ein weiteres Anheften des Thrombozyten am Subendothel zur Folge hat [73].

#### 2.3.2.3.3 Aktivierung über Kollagen plus Thrombin

Die simultane Bindung von Kollagen und Thrombin bewirkt eine synergistische Aktivierung der Thrombozyten. Diese sogenannten Collagen and thrombin- (COAT-) Thrombozyten machen etwa 30% der Gesamtpopulation der aktivierten Plättchen aus und weisen in mehreren Aspekten starke prokoagulatorische Eigenschaften auf [95]. Zum einen wurde gezeigt, dass sich vermehrt thrombogene Proteine der  $\alpha$ -Granula wie Fibrinogen, Fibronectin, VWF, TSP-1 und Faktor V auf der Thrombozytenoberfläche befinden [87]. Außerdem wurde eine vermehrte Oberflächenexpression von Phosphatidylserin (PS) beobachtet, welches gemeinsam mit Faktor V eine gesteigerte Aktivität der Prothrombinase ermöglicht wie sie bei keinem anderen Agonisten aufgezeigt wurde [96]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass über eine Serotonin-vermittelte Serotonylierung (via eine Transglutaminase FXIIIa) eine verbesserte Bindung zwischen einigen löslichen Liganden und deren Rezeptoren erfolgen kann. Beispielsweise bindet Fibrinogen vermehrt an GPIIb/IIIa, wodurch die thrombozytäre Aggregation verstärkt wird [87, 97].

Ein weiterer thrombogener Faktor ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Abschnürung von sogenannten Mikropartikeln von den Blutplättchen. Diese Subpopulation wirkt nicht nur prothrombotisch aufgrund der deutlichen Oberflächenvergrößerung, sondern sie ist durch Interaktion mit Leukozyten auch proinflammatorisch [70].

Darüber hinaus wurde auch eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) im Rahmen der COAT-platelets-Generierung beobachtet [98]. Mitochondrien stellen über die Atmungskette als wichtiger Energielieferant sicher, dass metabolische Prozesse der Thrombozyten, wie sie im Zuge einer Aktivierung auftreten, ablaufen

können. Des Weiteren können anhand des mitochondrialen Membranpotentials, welches über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird, Aussagen über den Aktivierungsgrad einer Zelle getroffen werden. Eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials (Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran) wurde beispielsweise auf aktivierten T-Lymphozyten beobachtet, wohingegen eine Reduzierung beziehungsweise ein Kollaps dieses Potentials (Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran) auf einen Zelluntergang (Apoptose) hinweist [99-101].

In der Arbeit von Remenyi G. et al wurde gezeigt, dass Veränderungen der mitochondrialen Membran an der Synthese von coated-platelets beteiligt sind und Apoptose-assoziierte Prozesse wie ein Verlust des MMP eine nicht unerhebliche Rolle im Aktivierungsprozess der Thrombozyten spielen [102].

#### 2.3.2.3.4 Rolle der extrazellulären Protein Disulfid Isomerase (PDI) bei der Thrombozyten-Aktivierung

Als intrazelluläres Chaperon sorgt die Protein Disulfid Isomerase (PDI) für eine adäquate Faltung der Proteine, die am rauhen ER produziert werden [103, 104]. Jedoch wurde auch gezeigt, dass die PDI auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten vermehrt lokalisiert ist [105]. PDI agiert als Disulfidreduktase und Thiolisomerase und kann so die Funktion von Oberflächenproteinen kontrollieren. Beispielsweise ermöglicht der von PDI katalysierte Disulfidgruppen-Austausch eine Konformationsänderung des Integrins GPIIb/IIIa und damit eine fundierte Bindung an Fibrinogen [106]. Neben der verbesserten Adhäsion ist PDI auch an der Granulasekretion beteiligt.

Darüber hinaus zeigte Jurk et al. in ihrer Arbeit, dass PDI auch die Bindung von Gerinnungsfaktoren auf Thrombin-aktivierten Plättchen reguliert und somit einen wichtigen Beitrag zur Thrombingenerierung und finalen Thrombusformation in der sekundären Hämostase leistet [103].

### 3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt. Darüber hinaus werden das Studiendesign und die Versuchsdurchführung erläutert.

#### 3.1 Geräte

Tabelle 6: Auflistung der angewendeten Geräte mit Typ- und Herstellerangabe

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

## 3.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Auflistung der angewendeten Verbrauchsmaterialien mit Typ- und Herstellerangabe

Bezeichnung	Typ	Hersteller
1,5 ml-Reagiergefäße	Safe Seal Gefäß (1,5ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
50 ml-Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden	Cellstar Tubes 50ml, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen)
5ml Reagenzröhrchen	Polystyrol	A. Hartenstein GmbH (Würzburg)
Blutentnahmeröhrchen	Monovette® (10ml) mit 0,106 M Citrat als Antikoagulans	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Kanüle mit Schlauch (Blutentnahme)	Safety-Multifly®-Set 21G plus Adapter 0,8x19 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Latexhandschuhe	Sempercure® Premium	Lohmann&Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied)
Mehrfachdispenser mit Spitzen	Stepper mit VWR Dispensor-12,5ml-Spitzen	VWR International GmbH (Darmstadt)
Pipettenspitzen	TipOne 0,1-10 µl TipOne 1-200 µl TipOne 1000 µl	Star Lab GmbH (Hamburg)
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

## 3.3 Reagenzien

Tabelle 8: Auflistung der angewendeten Reagenzien mit Angabe der Bezugsquelle

Bezeichnung	(Stamm-) Lösung	Bezugsquelle
1% (v/v) Formaldehyd	37% (v/v) Formaldehyd verdünnt mit PBS, pH 7,4	Carl Roth GmbH+KO. KG (Karlsruhe)
Adenosin 5'-diphosphat-Natriumsalz (ADP)	5 mM ADP in 0,9% (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
Ca <sup>2+</sup> Ionophore A23187	10 mM in DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
Convulxin (Heterodimeric C-Type lectin)	100 µg/ml gelöst in HBSS, pH 7,4	Enzo Life Sciences, Inc. (Lörrach)
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Merck KGaA (Darmstadt)
Fibrinogen Alexa 488	1 mg/ml in HBSS, pH 7,4	ThermoFischer Life Technologies GmbH (Ober-Olm)
GPRP (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH)	125 mM in 0,9% (w/v) NaCl	Bachem Distribution Services GmbH (Schweiz)

<b>HBSS (Hank's balanced Salt Solution)</b>		gibco® by life Technologies GmbH (Ober-Olm)
<b>JC1- Mitochondrial Membrane Potential Dye</b> 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide	5 mM in DMSO	Thermo Fischer Scientific Inc. (USA)
<b>Mepacrine (Quinacrine dihydrochloride)</b>	10 mM in PBS, pH 7,4	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	2 mol/l	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt)
<b>PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung)</b> KCl 2,7 mM NaCl 140 mM Phosphat 10 mM	10x PBS-Fertigprodukt 1:10 in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4	
<b>PBS Puffer 10x</b>	Pulver	AppliChem GmbH (Darmstadt)
<b>Ristocetin Sulfate</b>	15 mg/ml in 0,9% NaCl	American biochemical & pharmaceuticals Ltd. (USA)
<b>Salzsäure (HCl)</b>	2 mol/l	Carl Roth GmbH+KO. KG (Karlsruhe)
<b>α-Thrombin (bovin)</b>	100 U/ml in 0,9% (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (USA)

### 3.4 Antikörper

Tabelle 9: Auflistung der angewendeten Antikörper mit Angabe des Klons, Isotyps, Konjugation und Bezugsquelle

<b>Antikörper gegen</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Human CD62P (P-Selektin)</b>	AK-4	Maus, IgG1, κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
<b>Human CD63</b>	H5C6	Maus, IgG1, κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
<b>Human LAMP1 (CD107a)</b>	H4A3	Maus, IgG1, κ	PE	Becton Dickinson (USA)
<b>Schaf-anti-Maus-IgG</b>		Schaf IgG1, κ	FITC	Sigma-Aldrich (USA)
<b>Human aktiviertes GPIIb/IIIa (PAC 1)</b>	SP2/ BALB/c	Maus, IgG1, κ	FITC	Becton Dickinson (USA)

<b>Protein Disulfid Isomerase (anti-PDI)</b>	JAD 1	Maus, IgG2b		Dianova (Hamburg)
<b>Von Willebrand Faktor</b>	Polyklonal	Schaf, IgG	FITC	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

### 3.5 Software

Tabelle 10: Auflistung der angewendeten Software mit Herstellerangabe

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BD FACSDIVA Software© Becton, Version 6.1.3</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>EndNote™ X9</b>	Clarivate Analysis (USA)
<b>GraphPad Prism, Version 8</b>	GraphPad Software, Inc. (USA)
<b>Microsoft Office für iOS: Word, Excel, PowerPoint</b>	Microsoft Corporation (USA)
<b>Sysmex-Software; Version 1KXNH 00-10</b>	Sysmex Europe (Hamburg)

### 3.6 Studiendesign

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Datenerhebung fand innerhalb einer vom BMBF geförderten, grundlagenforschungsorientierten prospektiven Studie am Centrum für Thrombose und Hämostase Mainz (CTH) und der Universitätsmedizin Mainz statt (Abb. 8). Dabei soll die Analyse der Thrombozyten- und Leukozytenfunktion bei ET Patienten dazu dienen, um spezifische Pathomechanismen der klinischen Krankheitsausprägung näher zu charakterisieren und um Hypothesen über individuelle Risikofaktoren aufzustellen. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf den Pathomechanismen in der thrombozytären Aktivierung der ET Patienten im 1 Jahres Follow-Up. Zur Beantwortung der Fragestellung soll eine Beobachtungsstudie mit einem prospektiven, kontrollierten Längsschnittstudiendesign dienen.

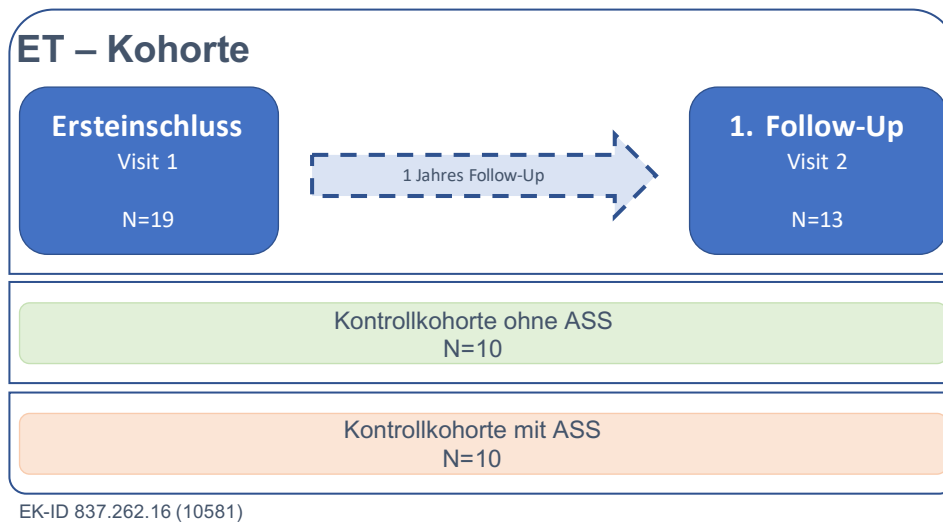


Abbildung 8: Study Flow der ET-Studie 837.262.16 (10581); EK Genehmigung vom 04.08.2016.

### 3.7 Probanden und Patienteneinschluss

#### 3.7.1 Fallzahl

Bei einer initialen Datenerhebung von 19 ET Neueinschlüssen und von diesen 13 ET Patienten mit Follow-Up-Untersuchungen weist die Studie eine relativ geringe Fallzahl auf. Jedoch wurde innerhalb der Versuche eine Vielzahl an Aktivierungsschritten und verschiedenen thrombozytären Signalwegen durchgeführt, sodass die Ergebnisse der Studie die Grundlage weiterer prospektiven Studien bilden könnte, um die Hypothesen über die individuellen Risikofaktoren zu verifizieren.

Hinzuweisen ist an dieser Stelle, dass die Untersuchung zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses von Charlotte H. im Rahmen einer weiteren Dissertation in der AG von Frau Dr. Kerstin Jurk durchgeführt worden sind.

#### 3.7.2 Genehmigung

Sowohl die Rekrutierung der Patienten als auch die Versuchsdurchführung erfolgte im Rahmen der Studie „Untersuchung der Thrombozyten- und Leukozytenfunktion bei Patienten mit Essentieller Thrombozythämie (ET),“ (Hauptprüfer: PD Dr. med. Thomas Kindler, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz). Vor Studienbeginn erfolgte die Genehmigung des Studienprotokolls durch das Ethik-Komitee der Universitätsmedizin Mainz (Landesärztekammer RP) (837.262.16 (10581) 04.08.2016).

### 3.7.3 Patienten-und Kontrollprobandenrekrutierung sowie Ein-und Ausschlusskriterien

In Kooperation mit der III. Medizinischen Klinik (Hämatologie, internistische Onkologie, Hämostaseologie, Stammzelltransplantation, Pneumologie) der Universitätsmedizin Mainz fand die Rekrutierung des Patientenkollektivs statt. Dabei wurden Patienten mit Verdacht auf beziehungsweise bereits diagnostizierter ET aufgeklärt, sodass die Blutentnahme nur nach Unterzeichnung der Einwilligungserklärung erfolgte. Für die Studienteilnahme wurden folgenden Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt:

Einschlusskriterien:

- Bestätigte ET Diagnose nach WHO-Kriterien
- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Bestätigte *JAK2* V617F oder *CALR* Mutation
- schriftliche Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien:

- Leukozytenzahl  $\geq$  20.000/ $\mu$ l
- Patienten mit akutem/subakutem thromboembolischem Ereignis (innerhalb 6 Wochen vor dem Einschluss in die Studie)
- Schwangerschaft
- ET Patienten mit *MPL* Mutationsstatus
- ET Patienten unter Interferon- $\alpha$  Therapie
- Nicht vorhandene Einverständniserklärung

Als Kontrollkollektiv dienten jeweils 10 gesunde, freiwillige Probanden nach einer dreitägigen Einnahme von 100 mg ASS/Tag sowie derselben Probanden ohne ASS-Einnahme. Darüber hinaus galt als Kriterium, dass die Probanden in den letzten 10 Tagen keine Thrombozyten-beeinflussende Medikation eingenommen hatten. Das Ethikvotum erfolgte im Rahmen der Probandenstudie „Physiologie und Biochemie der Wechselwirkung zwischen humanen Zellen des vaskulären Kompartiments“ (837.302.12(8403-F)/2018-13290\_1-Klinische Forschung.)

### 3.7.4 Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung

Im Rahmen dieser Studie wurden der Datenschutz sowie die ärztliche Schweigepflicht gemäß der europäischen Datenschutzgrundverordnung eingehalten. Es wurde

sichergestellt, dass die Studienteilnahme auf freiwilliger Basis erfolgte und die Einwilligung wurde nach Aufklärung schriftlich festgehalten. Die persönliche Datenerhebung über Alter, Geschlecht, aktueller Gesundheitszustand, Krankheitsverlauf (thromboembolische Ereignisse, Blutungsereignisse, therapeutische Maßnahmen) und die generierten Laborergebnisse wurden pseudonymisiert und auf gesicherten Servern mit Zugriff durch Studienbefugte gespeichert. Mit Einwilligung zur Studienteilnahme stimmten die Patienten/Probanden zu, dass die Daten an Dritte einschließlich im Rahmen von Publikationen in pseudonymisierter Form weitergegeben werden dürfen.

### 3.7.5 Statistische Datenauswertung

Die generierten Daten wurden zunächst in Microsoft Excel-Tabellen dokumentiert und die Patienten- und Probandencharakteristika in Tabellen aufgelistet. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über das Programm GraphPad Prism (Version 8) und zum Zwecke der visuellen Darstellung der Ergebnisse wurden Box-plots mit 5 bzw. 95% Perzentil-Darstellung angefertigt.

Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv ohne Angabe eines Signifikanzniveaus. Als statistische Tests wurde für den Vergleich von zwei Gruppen der t-test für stetig normalverteilte Daten angewendet und für die Daten, bei denen die Kriterien der Normalverteilung nicht erfüllt waren, kam der Mann-Whitney-Test zum Einsatz.

Mit beratender Unterstützung des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Mainz wurde die statistische Darstellung und Auswertung der Ergebnisse durchgeführt.

### 3.8 Venöse Blutentnahme

In einem Zeitfenster von bis zu 60 Minuten vor der Versuchsdurchführung erfolgte die Blutentnahme der Patienten in der hämatologischen und CTH Ambulanz an der Universitätsmedizin Mainz beziehungsweise direkt vor Ort im Labor des CTHs (Kontrollprobanden). Dabei wurde im Regelfall eine Vene in der Ellenbeuge (V. mediana cubiti, V. basilica/ cephalica antebrachii) mithilfe einer 21-Gauge Nadel punktiert und das Blut in 10 ml Sarstedt-Citrat-Monovetten entnommen. Das in den Monovetten enthaltene Citrat (finale 10,6 mM Tri-Natriumcitrat-Konzentration) diente zur Antikoagulation. Um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern, wurden die

Blutröhrchen vorsichtig geschwenkt, damit das enthaltene Blut gleichmäßig mit dem Antikoagulant in Kontakt gebracht wurde. Außerdem wurde darauf geachtet, dass rigoroses Schütteln der Blutproben sowie starke Temperaturschwankungen vermieden worden sind, da dies ebenfalls zu einer Präaktivierung der Thrombozyten führen kann.

Mithilfe des Sysmex-Zellcounters wurde anschließend ein kleines Blutbild aus einem zusätzlich entnommenen EDTA-Blutröhrchen generiert und somit die wichtigsten Blutparameter numerisch festgehalten.

### 3.9 Preparation von Plättchen-reichem Plasma (PRP)

Das zur Analyse der Thrombozytenfunktion ausgewählte Medium wurde in dieser Arbeit in Form von Plättchen-reichem Plasma (PRP) festgelegt. Dessen Herstellung erfolgte durch Zentrifugation der blutgefüllten Citrat-Monovetten für 10 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur mit langsamer Abbremsung. Dadurch wurden die Blutzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten in drei Phasen aufgetrennt: In der untersten Schicht befanden sich die Erythrozyten, die über eine leukozytäre „Buffy coat“ von der obersten Schicht, dem PRP, getrennt worden sind. Das so gewonnene PRP wurde vorsichtig mithilfe einer Transferpipette in ein Polystyrene-Röhrchen (FACS Tube) übertragen (Abb. 9). Dabei wurde beachtet, dass ein Abstand von circa einem cm über der roten Zellschicht eingehalten wurde, damit keine Kontamination des PRP mit Leukozyten erfolgte. Im gewonnenen PRP wurde ebenfalls die Thrombozytenkonzentration im Sysmex bestimmt.

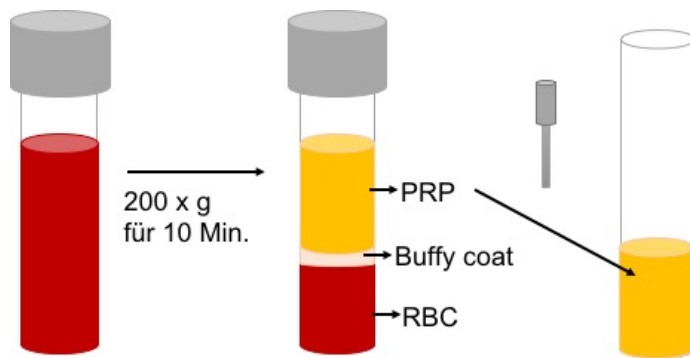


Abbildung 9: Schema zur Gewinnung von PRP aus peripherem Citrat-Vollblut mittels Zentrifugation.

### 3.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie gehört heutzutage zu einer der wichtigsten Messverfahren in der Thrombozytenfunktionsanalyse. Neben der Messung von Aktivitätsparametern bei einer Thrombose- beziehungsweise Blutungsneigung wie es in der vorliegenden Arbeit Anwendung findet, dient die Durchflusszytometrie außerdem zur Diagnose von hereditären und erworbenen Thrombozytendefekten sowie zum Monitoring einer therapeutischen Thrombozyteninhibition [88].

#### 3.10.1 Technisches Prinzip

Um Aussagen über die Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen treffen zu können, werden die Zellen einer Probe nacheinander und einzeln von einem Laserstrahl in einer Messkammer detektiert. Dies wird über das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung erreicht. Dabei wird die zu analysierende Probe von einer Kapillare angesaugt und in einem zentralen Flüssigkeitskanal in Richtung Messkammer geleitet. Um dort eine Beschleunigung der Flussgeschwindigkeit der Zellen zu erreichen, ist der zentrale Kanal von einer schneller fließenden Flüssigkeit umgeben, die sich unter laminaren Strömungsbedingungen nicht mit der zentralen Flüssigkeit vermischt. Zusätzlich wird eine Beschleunigung des zentralen Flüssigkeitskanals über eine Verjüngung des Kanals in Richtung Messkammer hervorgerufen. Beide Phänomene resultieren darin, dass die Zellen der Probe einzeln die Detektoren passieren können.

Im Anschluss folgt die Charakterisierung der Partikel über drei Parameter. Zum einen wird das vorwärts gestreute Licht von einer Linse, der sogenannten Forward Scatter

Channel (FSC), gesammelt und über den Computer als elektrisches Signal angezeigt. Dies ermöglicht, eine Aussage über die relative Größe des Partikels zu treffen.

Daneben wird der Laserstrahl durch die Partikel auch seitlich gestreut und von Detektoren, die orthogonal zum ursprünglichen Laserstrahl verlaufen, registriert (side scatter channel, SSC). Dies dient zur Charakterisierung des Zellinhaltes, beispielsweise über die Granularität oder der Beschaffenheit des Vesikelgehaltes einer Zelle.

Als dritten Punkt macht man sich die Fluoreszenz zur näheren Beschreibung der Partikel zu nutze. Dabei werden Fluorochromgekoppelte Antikörper, Adhäsionsproteine oder fluochrome Reagenzien genutzt, um Oberflächenstrukturen- und Proteine (Rezeptoren) oder auch intrazelluläre Moleküle wie DNA oder Adeninnukleotide (ADP/ATP) zu identifizieren. Die Emission und Detektion der Fluoreszenz erfolgt nachdem die Elektronen der Fluorochrome zunächst vom einfallenden Laserstrahl angeregt werden und anschließend diese Energie in Form von Fluoreszenz abgeben.

Die in dieser Arbeit angewendeten Fluorochrome sind die Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (PE).

Zur quantitativen Datenauswertung eines Parameters eignet sich das Histogramm. Soll ein Vergleich von multiparametrischen Daten erfolgen, wird das Punktediagramm (dot-Plot) angewendet (Abb. 10).

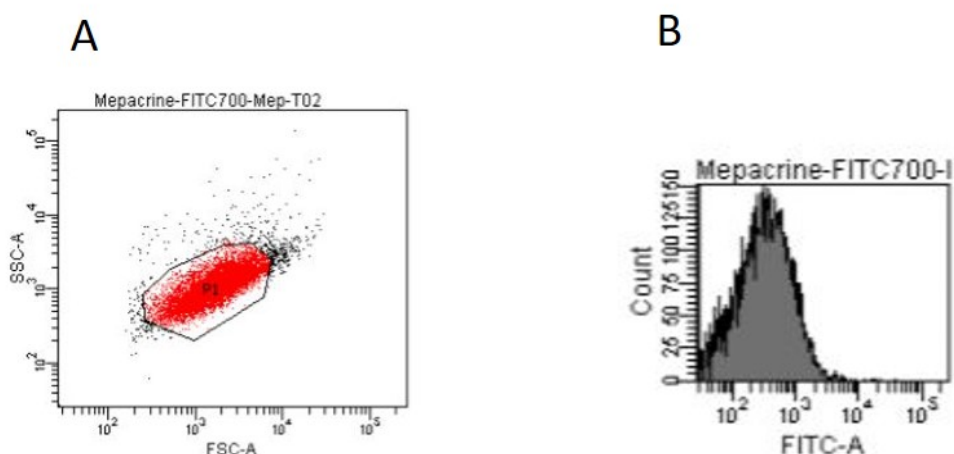


Abbildung 10: Exemplarische Datenauswertung am Durchflusszytometer. (A) Dot plot von mit Mepacrine-gefärbten und mit Thrombin 0,2 U/ml aktivierten humanen Thrombozyten eines Kontrollprobanden ohne ASS mit der FSC (X-Achse) gegen die SSC (Y-Achse). (B) Histogramm mit der FITC-Fluoreszenzintensität (X-Achse) gegen die Anzahl (Y-Achse).

### 3.11 Versuchsdurchführung

#### 3.11.1 Thrombozytenfunktionstest

Ziel der Thrombozyten-Funktionstests ist es, Aussagen über das Aktivierungspotential *in vivo* und Reaktivität *in vitro* der Plättchen zu treffen. Dazu werden die im PRP enthaltenen Thrombozyten mittels verschiedener Agonisten *in vitro* aktiviert und anschließend die erfolgte Reaktion über Aktivierungsmarker am Durchflusszytometer erfasst.

##### 3.11.1.1 Thrombozyten-Agonisten

Die in dieser Arbeit angewendeten Thrombozyten-Agonisten waren Thrombin, Convulxin, ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor A23187 und Ristocetin.

Thrombin ist wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert einer der potentesten Aktivatoren der Thrombozyten. Wichtig ist, dass man bei der Anwendung von Thrombin auf eine gleichzeitige Zugabe von dem Tetrapeptid Gly- Pro- Arg- Pro (GPRP) achtet, da dieses eine Fibrinpolymerisation inhibiert [107].

Über Convulxin, ein Derivat des Gifts der *Crotalus durissus terrificus* Schlange, kann eine spezifische Aktivierung des Kollagen- Rezeptor GPVI erreicht werden [108].

Eine thrombozytäre Aktivierung über ADP erfolgt über die Rezeptoren  $\text{P2Y}_1$  und  $\text{P2Y}_{12}$ .

$\text{Ca}^{2+}$  Ionophor A23187 ermöglicht eine Bindung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und dessen Freisetzung, wodurch mehrere Schritte der Thrombozytenaktivierung in Gang gesetzt werden, wie beispielsweise die Granulasekretion [109].

Das Antibiotikum Ristocetin reduziert die elektrostatische Abstoßung zwischen dem VWF und dem GP-Ib-IX, wodurch die Adhäsion der Thrombozyten an den VWF *in vitro* ohne Ausübung von Scherstress erfolgen kann [110].

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden als erster Schritt die genannten Thrombozyten-Agonisten in aufsteigender Konzentration (siehe Tabelle 11: Pipettierschema der Agonisten in aufsteigender Konzentration) in die Reaktionsröhrchen pipettiert.

Tabelle 11: Pipettierschema der Agonisten in aufsteigender Konzentration

Agonist „Tube“	Ristocetin [mM]	Convul- xin (Cvx) [ng/ml]	Thrombin (Thr) [U/ml]	Thr+ Cvx [U/ml]+ [ng/ml]	Thr+ADP [U/ml]+ [mM]	Cvx+ ADP [ng/ml]+ [mM]	Ca <sup>2+</sup> - Ionophor [μM]
I	0	0	0	0+ 5	0+ 0,375	0+ 0,375	20
II	0,4	1,25	0,025	0,025+ 5	0,025+ 0,375	1,25+ 0,375	-
III	0,6	2,5	0,05	0,05+ 5	0,05+ 0,375	2,5+ 0,375	-
IV	0,8	5	0,1	0,1+ 5	0,1+ 0,375	5+ 0,375	-
V	1	20	0,2	0,2+ 5	0,2+ 0,375	20+ 0,375	-

### 3.11.1.2 Thrombozyten-Aktivierung

Zur Aktivierung wurden jeweils 100 μl von verdünntem PRP (Verdünnung mit PBS, pH 7,4 im Verhältnis 1:7) zu den Agonisten hinzugegeben. Dabei sollte dies möglichst in einem schwungvollen Pipettiervorgang erfolgen, um eine gleichmäßige Aktivierung der im PRP enthaltenen Plättchen zu gewährleisten.

### 3.11.1.3 Plättchenfixierung und Plättchenwaschen

Nach einer einheitlichen 6-minütigen Aktivierungszeit bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Bewegung der Röhrchen wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl 1% Formaldehyd (Endkonzentration 0,5% FA) beendet und für 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch eine Fixierung der Proben erreicht wird. Im Anschluss sollte das überschüssige Formaldehyd gewaschen und entfernt werden, weshalb die Proben mit 1ml PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei 800 xg (Raumtemperatur) mit maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert wurden. Der Überstand mit dem enthaltenen Formaldehyd wurde über eine Pasteurpipette entfernt.

Die Proben, die für die PAC-1-Markierung vorgesehen waren, bildeten insofern eine Ausnahme, dass diese nach der 6- minütigen Aktivierungszeit direkt mit dem Antikörper PAC-1 versehen worden sind und erst nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur die Fixierung mit FA erfolgte. Der Grund hierfür ist, dass der PAC-1-Antikörper nicht an bereits fixierten Thrombozyten binden kann und daher die Antikörper-Markierung vor der Fixierung stattfinden muss.

## 3.11.1.4 Antikörper-Markierung (Aktivierungsmarker)

Nachdem die Proben fixiert und gewaschen worden sind, erfolgte die Benetzung mit den Aktivierungsmarkern über Fluorochrom-markierte Antikörper. Dabei binden diese auf verschiedene Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten und können mithilfe der durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenz ausgewertet werden. In der folgenden Tabelle sind die angewendeten Marker mit dem zugehörigem Epitop aufgelistet.

Tabelle 12: Überblick der thrombozytären Aktivierungsmarker und den zugehörigen Targets. [111]

<b>Antikörper-Marker (pipettiertes Volumen)</b>	<b>Antigen/Target/Epitop</b>	<b>Anmerkung</b>	<b>Aktivierung über TZ- Agonisten</b>
<b>VWF-Antikörper (5 µl/100 µl Probe)</b>	GPIIb $\alpha$	Vorverdünnung des Anti-VWF-AK mit 1:100 PBS	Ristocetin, Thr, Cvx, Thr+Cvx
<b>CD62P (5 µl/100 µl Probe)</b>	P-Selectin	Marker für $\alpha$ -Granula Freisetzung. Nach TZ-Aktivierung wird P-Selectin auf die Plättchenoberfläche transloziert.	Thr, Cvx, Thr+Cvx, Thr+ADP, Cvx+ADP, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor
<b>CD63 (5 µl/100 µl Probe)</b>	CD 63, LIMP-1 (lysosomal integral membrane proteine 1)	Marker für dense-Granula und lysosomale Granula Freisetzung.	Thr, Cvx, Thr+Cvx, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor
<b>PAC-1 (5 µl/100 µl Probe)</b>	Aktiviertes GPIIb/IIIa	Bindung an Fibrinogenbindungsstelle nur nach Konformationsänderung des GPIIb/IIIa (aktivierte Plättchen.)	Thr, Cvx, Thr+Cvx, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor
<b>CD107a (5 µl/100 µl Probe)</b>	LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein 1)	Marker für lysosomale Granula Freisetzung.[67]	Thr, Cvx, Thr+Cvx, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor
<b>Fibrinogen Alexa Fluor 488 (Endkonzentration: 100 µg/ml)</b>	GPIIb/IIIa		Thr, Cvx, Thr+Cvx, Ca <sup>2+</sup> -Ionophor

<b>Mepacrine</b> <b>(Endkonzentration:</b> <b>5 <math>\mu</math>M)</b>		Marker für dense-Granula-Freisetzung. Aufnahme in die dense Granula und Ausschüttung bei Agonisten-Aktivierung. Vorverdünnung des Mepacrines (10 mM Stammkonzentration) mit 1:100 PBS	Thr, Cvx, Thr+Cvx,
--	--	--	-----------------------

Abkürzungen: Thr: Thrombin, Cvx: Convulxin, ADP: Adenosindiphosphat.

Zur Antikörperinkubation wurden die Proben für 45 Minuten auf einen Schüttler mit 120 rpm bei Raumtemperatur platziert. Im Anschluss waren diese bereit zur Messung nachdem 500  $\mu$ l PBS hinzugegeben wurden.

### 3.11.1.5 Messung am Durchflusszytometer

Der letzte Schritt der Versuchsdurchführung war die Messung der Proben am Durchflusszytometer. Dabei wurden die Proben einzeln gemessen, nachdem die enthaltenen Thrombozyten durch kurzes Vortexen in Suspension gebracht wurden.

Pro Probenröhrchen wurde eine Eventzahl von 10.000 Zellen in der Thrombozyten-Population gewählt und über ein P1-Areal-Gating möglichst die Thrombozyten erfasst, die einzeln und nicht als Aggregate vorliegen (siehe Abbildung 10).

### 3.11.2 Assay zur Analyse der PDI-Expression auf der Thrombozyten-Oberfläche

Mithilfe eines anti-PDI-Antikörpers wurde die Expression der Protein Disulfid Isomerase (PDI) auf der thrombozytären Oberfläche nachgewiesen und durch Messung am Durchflusszytometers quantifiziert. Dabei wurden zunächst 1%-Formaldehyd-fixierte Thrombozyten (Endkonzentration: 0,5% Formaldehyd) mit murinem anti-PDI-Antikörper (1 $\mu$ l anti-PDI-AK auf 100  $\mu$ l fixierte Thrombozyten-Probe) für 45 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach Waschen mit 1ml PBS und Zentrifugation (800 G, RT, 10 Minuten) erfolgte anschließend eine Inkubation mit FITC gekoppelten „Schaf-anti-Maus-IgG“ Antikörpern (Endkonzentration 1:150). Letztere erkennen die Maus IgG-Proteine des murinen anti-PDI-Antikörpers und liefern somit indirekt (sekundärer Antikörpernachweis) einen Nachweis über die Expression der PDI Proteine. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle angelegt, die neben den fixierten

Thrombozyten nur den sekundären Antikörper („anti-mouse-IgG Antikörper“) enthielten, um so die unspezifische Bindung dieses Antikörpers zu detektieren.

Für die Auswertung wurde die Fluoreszenz der Negativkontrollen von der Fluoreszenz der Proben mit anti-PDI Antikörpern subtrahiert. Diese errechnete „mean fluorescence intensity“ ist proportional zu der Menge der PDI Expression auf der Thrombozytenoberfläche.

### 3.11.3 Assay zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)

Mithilfe des Farbstoffes JC-1 konnten am Durchflusszytometer Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP,  $\Delta\psi_m$ ) in den Thrombozyten nachgewiesen werden. JC-1 zählt als zu den Farbstoffen der Carbocyanine und akkumuliert in der inneren Mitochondrienmembran (negativ geladen) aufgrund seiner positiven Ladung [112].

Zur Untersuchung des MMPs der Thrombozyten wurde der Farbstoff JC-1 (1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) mit 1:7 verdünntem PRP (100  $\mu\text{l}$ ) im Wasserbad (37°C) inkubiert und anschließend direkt am Durchflusszytometer erfasst und ausgewertet. Die eigentlich vorgesehene Vorverdünnung des JC-1 in DMSO (1:10) wurde fälschlicherweise nicht durchgeführt. Da jedoch der Quotient der Ergebnisse ausgewertet wurde, wurde dieser Assay nicht aus der Analyse ausgeschlossen.

Herrscht ein niedriges mitochondriales Membranpotential, akkumuliert JC-1 nur wenig in den Mitochondrien und liegt überwiegend als Monomer vor, welches eine grüne Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 530 nm emittiert. Im Gegensatz dazu aggregiert JC-1 in höheren Konzentrationen wie es der Fall bei einem hohen mitochondrialen Membranpotential ist und emittiert dort eine rot-orangefarbene Fluoreszenz (590 nm) [113].

Als sogenannter „dual-emission“ Indikator können mithilfe von JC-1 sowohl die Monomere mit grüner Fluoreszenz (530 nm) als auch die Aggregate mit orange-roter Fluoreszenz (590 nm) gemessen werden [114]. Dabei werden die gemessenen Werte der beiden Fluoreszenzen (FL2 (590 nm)/FL1 (530nm)) ins Verhältnis miteinander gesetzt und dieser Quotient spiegelt die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials der Thrombozyten wider.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik

#### 4.1.1 Patienten-und Probandencharakteristika

In dieser Arbeit wurden 13 ET Patienten der initial 19 eingeschlossenen Patienten (Ersteinschluss, ES) nach einem Jahr wieder untersucht (1. Follow-Up, 1.FU). Die klinischen und demographischen Merkmale der Patienten des 1.FU sind in Tabelle 13 und die laborchemischen Blutwerte in Tabelle 14 aufgeführt.

Hervorzuheben ist, dass bei zehn Patienten eine *JAK2* V617F Mutation diagnostiziert wurde und bei drei Patienten eine *CALR* Mutation nachgewiesen wurde. Diese Verteilung repräsentiert in etwa die Mutationsverteilung aller ET Patienten (65% *JAK2* V617F vs. 25% *CALR*). Insgesamt erhielten neun Patienten im Ersteinschluss eine zytoreduktive Therapie mit HU, wovon bei vier Patienten zum Zeitpunkt des 1.FU HU wieder abgesetzt wurde. Zwei dieser Patienten (P9 und P10) wechselten die Therapie im 1.FU auf Anagrelid und ein Patient (P12) auf Interferon-alpha, wohingegen bei einem Patienten (P13) nach Absetzen von HU keine weitere zytoreduktive Therapie angesetzt wurde. Unabhängig des Untersuchungszeitpunktes nahmen elf der Patienten ASS ein, entweder in Kombination mit der Zytoreduktion oder als alleinige Gabe. Die Mehrzahl der Patienten (9 Patienten) gab eine hämorrhagische Diathese (Blutungen) an. Im Gegensatz dazu kam es bei vier Patienten zu thromboembolischen Ereignissen, die alle aus der Patientengruppe mit einer *JAK2* V617F Mutation stammten. Darüber hinaus wurde bei zwei Patienten (P9 (*JAK2* V617F) und P13 (*CALR*)) im 1.FU eine Myelofibrose diagnostiziert, welche, da sie sich im Rahmen einer ET entwickelte, auch als eine Post-ET-Myelofibrose (Post-ET-MF) angesehen werden kann.

In Bezug auf die Thrombozyten-Konzentration lag diese bei den 1.FU ET Patienten mit einer HU Therapie durchweg unterhalb der ET-Thrombozyten-Konzentrations-Marke ( $450 \times 10^9/L$ ), sodass eine Normalisierung der Thrombozyten-Konzentration unter der HU Therapie erreicht wurde (siehe Abb. 10, A). Die Ausnahme bildete dabei der Patient P1, der trotz Zytoreduktion eine steigende Thrombozyten-Konzentration aufwies. Im Gegensatz dazu, war eine steigende Tendenz der Thrombozyten-Konzentration der 1.FU ET Patienten ohne HU Therapie zu beobachten. Hinzukommt, dass sich bis auf einen Patienten (P8) die Thrombozyten-Konzentration hierbei oberhalb der ET-Thrombozyten-Konzentrations-Marke ( $450 \times 10^9/L$ ) befand.

Desweiteren lag bei einem Patienten (P5) dieser Patientengruppe die höchste Thrombozyten-Konzentration der gesamten ET Patientenkohorte dieser Studie vor, welche jedoch eine fallende Tendenz zeigte. Zusätzlich zu dieser extremen Thrombozytose wurde bei diesem Patienten (P5) ein erworbenes VWS laborchemisch diagnostiziert, welches bei einer VWF Aktivität/Antigen Ratio unter 0,7 vorliegt (P5: VWF Akt/Ag Ratio 0,59).

Die Entwicklung der Thrombozyten-Konzentration der Patienten (P9, P13), bei denen es zu einer Post-ET-MF im 1.FU kam, wies eine stark fallende Tendenz auf (siehe Abb 10, B). Dabei wurde die ET-Thrombozyten-Konzentrations-Marke ( $450 \times 10^9/L$ ) in beiden Fällen unterschritten und darüber hinaus die Thrombozyten-Konzentration beider Kontrollgruppen (K-mit ASS und K-ohne ASS) erreicht.

Bei den Patienten (P10, P12), die während des 1.FU einen Therapiewechsel auf eine andere Zytoreduktion (Anagrelid, Interferon-alpha) erhielten, blieb die Thrombozyten-Konzentration nahezu konstant knapp oberhalb der ET-Thrombozyten-Konzentration von  $450 \times 10^9/L$ .














Als Kontrollen dienten zehn gesunde Probanden, deren Thrombozyten-Funktion jeweils mit und ohne ASS analysiert wurde.

Tabelle 13: Übersicht der klinischen und demographischen Eigenschaften der 1.FU ET Patienten.

Probanden	Alter (Geschlecht)	Mutation	Therapie mit HU		ASS	CVRF	Klinik				Progress
			ES n=9	1.FU n=5			n=11	n=11	Thrombose n=4	Blutung n=9	
P1 	61 J. (w)	JAK2 V617F	X	X	X	X	-	X	X	X#	-
P2 	88 J. (m)	JAK2 V617F	X	X	X	X	-	X	-	-	-
P3 	70 J. (m)	JAK2 V617F	X	X	X	X	X	-	-	-	-
P4 	78 J. (m)	JAK2 V617F	X	X	-	X	-	X	-	-	-
P5 	32 J. (w)	JAK2 V617F	-	-	X	-	-	X	X	X#§	-
P6 	52 J. (w)	JAK2 V617F	-	-	X	-	-	X	X	X#	-
P7 	53 J. (w)	JAK2 V617F	-	-	X	X	X	X	-	X#	-
P8 	57 J. (w)	JAK2 V617F	-	-	X	X	X	-	-	-	-
P9 	52 J. (w)	JAK2 V617F	X	-*	-	X	X	X	X	X#	X
P10 	58 J. (w)	JAK2 V617F	X	-*	X	X	-	X	X	X#	-
P11 	61 J. (w)	CALR	X	X	X	X	-	-	X	-	-
P12 	44 J. (m)	CALR	X	-*	X	X	-	-	-	-	-
P13 	73 J. (w)	CALR	X	-*	X	X	-	X	-	X#	X
Mittelwert (Range)	59,9 J. (32-88)										
m:w	4:9										

Abkürzungen: ASS: Acetylsalicylsäure, CVRF: Kardiovaskuläre Risikofaktoren, ES: Ersteinschluss, 1.FU: 1.-Follow-Up, MZS: Mikrozirkulationsstörungen, VWS: von Willebrand Syndrom, \*: Therapiewechsel, #: anamnestisches erworbenes VWS, §: laborchemisch nachgewiesenes erworbenes VWS.

Tabelle 14: Übersicht der Laborparameter der 1.FU ET Patienten.

Probanden	Thrombozyten (x 10 <sup>9</sup> /L)		Fibrino- gen (mg/dl)	VWF			Leuko- zyten (x 10 <sup>9</sup> /L)	Erythro- zyten (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hämoglobin (g/dL)		Hämatokrit (%)
	ES	1.FU		Antigen	Aktivi- tät	Akt/Ag			ES	1.FU	
P1 	467	710	271				6,1	4,08	12	12,8	38,8
P2 	452	318	326	154	140	>0,7	8	4,3	14,8	13	38,4
P3 	405	344					6	4,57	14,9	13,8	40,8
P4 	329	353					5,5	3,09	12,7	12,9	34,7
P5 	1282	1038		85	50	<0,7* (0,59)	8	4,58	13,8	13,1	39,1
P6 	663	744		119	89	>0,7	7	4,37	12,9	12,2	36,8
P7 	599	732	152	138	96	>0,7	5,2	4,35	13,4	13,1	38,7
P8 	281	401	273				4,2	5,09	12,8	13,3	40,6
P9 	973	224		214	178	>0,7	11,5	4,39	12,4	15,3	49
P10 	484	503	411	98	92	>0,7	6,1	4,3	12,4	13,2	40
P11 	473	374	326				8,3	2,56	9,9	9,3	25,7
P12 	550	534	395	156	116	>0,7	4,7	4,28	12,3	12,2	35,8
P13 	615	301	304	129	98	>0,7	6	3,44	10,1	9,5	28,5
Mittelwert (Range)	567,7 (281- 1282)	501,2 (224- 1038)	307,25 (152- 411)	136,63 (85-214)	107, 38 (50- 178)		6,7 (4,2- 11,5)	4,1 (2,56- 5,09)	12,3 (10,1- 14,9)	12,2 (9,3- 15,3)	37,5 (25,7- 49)

Abkürzungen: VWF: Von Willebrand Faktor, ES: Ersteinschluss, 1.FU: 1. Follow-up, Akt/Ag: Aktivität/Antigen, \*: diagnostiziertes erworbenes WVS (VWF Akt/Ag Ratio <0,7)

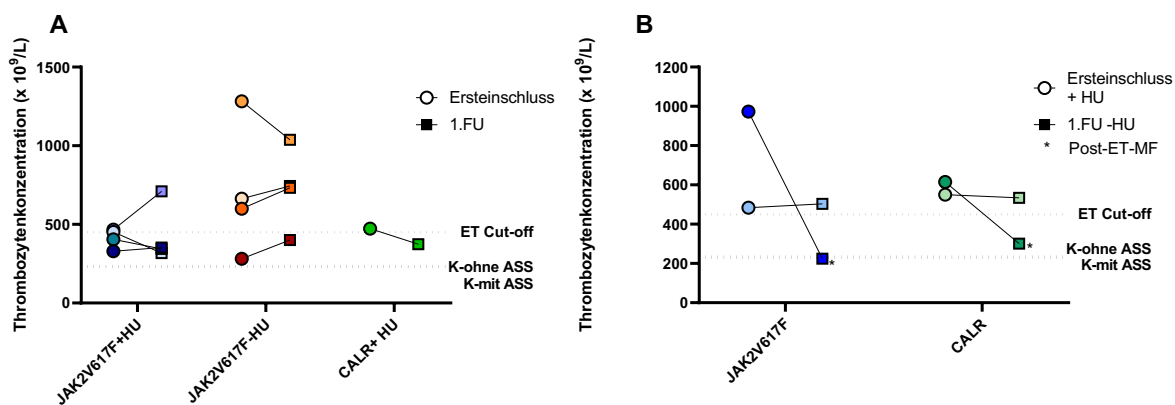


Abbildung 11: Übersicht der Thrombozytenkonzentration im Ersteintritt, 1.Follow-Up (1.FU) und der Kontrollen mit ASS (K-mit ASS) und ohne ASS (K-ohne ASS) bei (A) ET Patienten ohne Therapiewechsel und (B) ET Patienten mit Therapiewechsel auf Anagrelid (P9, P10), Interferon-alpha (P12) und keine Zytoreduktion (P13). ET-Thrombozyten-Konzentrations-Marke bei  $450 \times 10^9/L$ , K-mit ASS und K-ohne ASS mit angegebenem Mittelwert. \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P9: ● P10: ● P11: ● P12: ● P13: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P9: ■ P10: ■ P11: ■ P12: ■ P13: ■

Tabelle 15: Übersicht der Kontrollprobanden mit jeweils 10 Probanden vor und nach 3 tägiger ASS-Einnahme (100g).

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

Angabe des Mittelwertes plus min; max Werte.

## 4.2 Explorative Datenanalyse

### 4.2.1 Gruppenvergleich

Im Folgenden wurde die Thrombozyten-Funktion des 1.FU der Patientengruppen (*JAK2 V617F* Mutation und *CALR* Mutation) mit den Kontrollgruppen (Kontrollen ohne ASS, Kontrollen mit ASS) anhand verschiedener Parameter, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert worden sind, verglichen.

#### 4.2.1.1 Vergleich der Granulasekretion (CD62P, CD63, LAMP-1)

Mithilfe des CD62P-Antikörpers wurde die Freisetzung der  $\alpha$ -Granula näher charakterisiert. Zur Beurteilung der lysosomalen und  $\delta$ -granulären Freisetzung dienen der CD63-Antikörper und LAMP-1 Antikörper, wobei letzterer eine spezifische Aussage über die lysosomale Sekretion erlaubt.

##### 4.2.1.1.1 Vergleich der basalen Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche

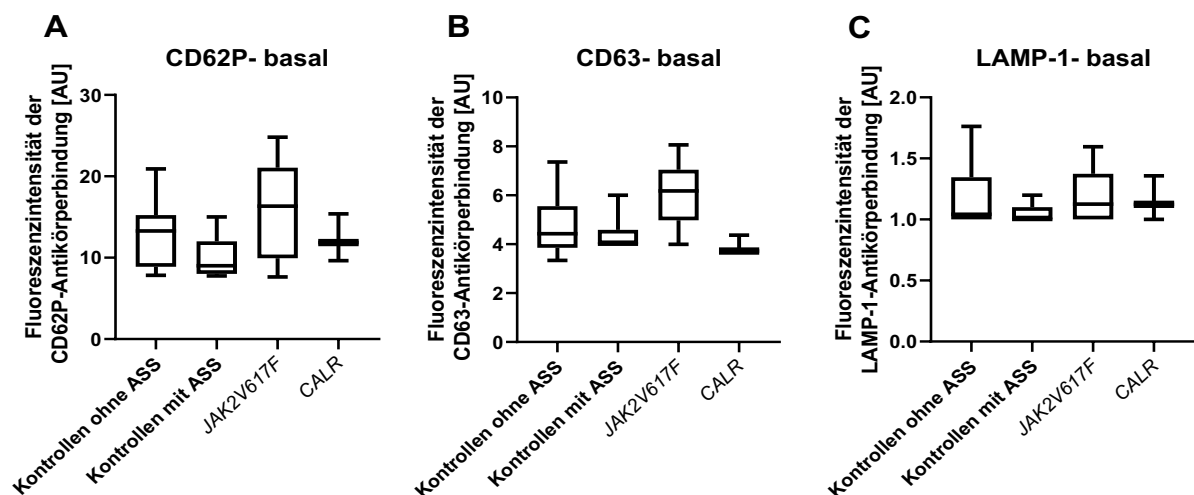


Abbildung 12: Basale Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Im nicht aktivierten Zustand der Thrombozyten wurde innerhalb der Kontrollgruppe bei den Kontrollen ohne ASS tendenziell mehr CD62P exprimiert als bei diejenigen mit ASS, jedoch ohne eine statistische Auffälligkeit. Die basale Expression von CD62P der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten hingegen zeigte insgesamt eine höhere

Tendenz im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. 1.FU ET-Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation wiesen hierbei einen statistisch auffälligen Unterschied zu den Kontrollen mit ASS auf (unpaired t-Test,  $p=0,0088$ ).

Bezüglich der basalen thrombozytären Präsentation von CD63 zeigte sich innerhalb der Kontrollgruppe keine nennenswerten Unterschiede. Die CD63 Expression auf den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation war im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Statistisch auffällig war der Unterschied der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0401$ ) und mit ASS (Mann-Whitney test,  $p=0,0060$ ). Die Thrombozyten der Patienten der *CALR*-Gruppe hingegen zeigte ein vergleichbares Expressionsniveau wie die Kontrollgruppen.

Wie auch bei der Expression von CD63 konnte bei der basalen LAMP-1 Expression innerhalb der Kontrollgruppen keine Unterschiede festgestellt werden. Die basale lysosomale Aktivierung Aktivität der ET Patienten im Follow-up war ähnlich wie die der Kontrollgruppen unabhängig des Mutationsstatus.

#### 4.2.1.1.2 Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml)

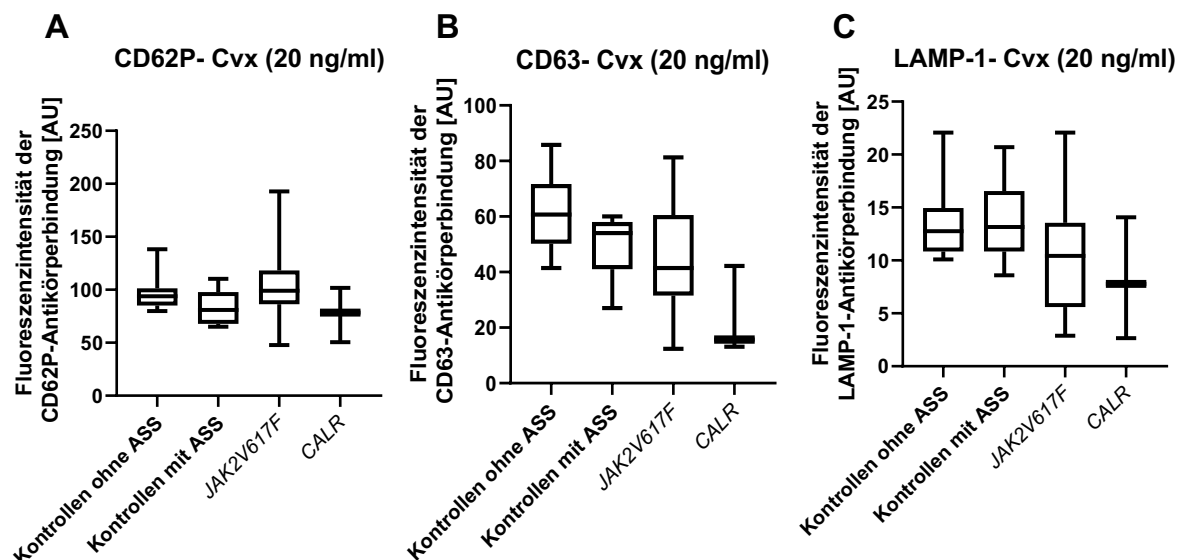


Abbildung 13: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Um eine Aktivierung über den GPVI-Rezeptor zu erzielen, wurden die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten und der Kontrollprobanden mit Convulxin in aufsteigenden Konzentrationen (1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 20 ng/ml) stimuliert. Die dabei ermittelte Konzentrationskinetik zeigte einen sigmoiden Kurvenverlauf, wobei die Oberflächenexpression der Parameter dosisabhängig bis max. bei 20 ng/ml Convulxin gestiegen ist. Anhand der Auswertung bei einer Konzentration von 20 ng/ml Convulxin wurde somit die stärkste thrombozytäre Aktivierung und damit die stärkste Granulasekretion der Thrombozyten erreicht, dargestellt über eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität aller drei Parametern im Vergleich zur basalen Expression.

In Bezug auf die Kontrollgruppen konnte sowohl eine verminderte CD62P als auch CD63 Expression auf den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS beobachtet werden. In der CD63 Expression zeigte sich dieser Unterschied mit einer statistischen Auffälligkeit (unpaired t-Test,  $p= 0,0305$ ). Die thrombozytären LAMP-1 Expression innerhalb der Thrombozyten der Kontrollgruppen zeigte sich hingegen auf einem vergleichbaren Niveau.

Bei isolierter Betrachtung von CD62P exprimierten die Thrombozyten der Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ebenfalls vermehrt dieses im Vergleich zu den Kontrollgruppen, allerdings wurde kein statistisch auffälliges Niveau erreicht. Die Thrombozyten der Patienten mit einer *CALR* Mutation hingegen verhielten sich nach Aktivierung mittels Convulxin (20 ng/ml) vergleichbar mit den Kontrollen mit ASS.

Im Gegensatz dazu wurde eine verminderte Expression von CD63 auf den mit Convulxin (20 ng/ml) stimulierten Thrombozyten bei allen ET Patienten im 1.FU im Vergleich zu den Kontrollen registriert. Dies zeigte sich mit einer statistischen Auffälligkeit bei ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test,  $p= 0,0348$ ). Ebenso war der Unterschied statistisch auffällig bei der Patientengruppe mit *CALR* Mutation in Relation zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test,  $p= 0,0016$ ) sowie mit ASS (unpaired t-Test,  $p= 0,0046$ ).

Ähnlich wie die CD63-Expression war auch die LAMP-1 Präsentation bei den Thrombozyten der ET-Patienten des 1.FU nach Aktivierungsreiz mit Convulxin 20 ng/ml tendenziell niedriger im Vergleich zu den Kontrollgruppen, allerdings ohne statistische Auffälligkeiten.

#### 4.2.1.1.3 Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml)

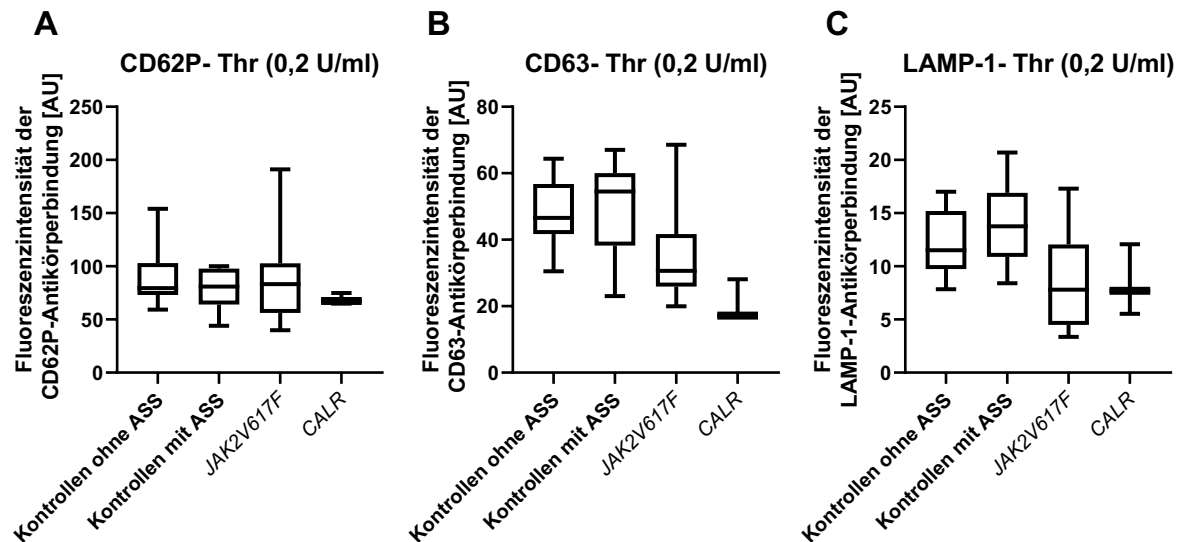


Abbildung 14: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Analog zur Aktivierung über Convulxin, wurden die Thrombozyten mit dem Agonisten Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen (0 U/ml, 0,025 U/ml, 0,05 U/ml, 0,1 U/ml, 0,2 U/ml) aktiviert. Auch hier ergab sich ein sigmoider Kurvenverlauf der Konzentrationskinetik mit einer max. Aktivierung der Thrombozyten und Granulasekretion durch die höchste Thrombin-Konzentration (0,2 U/ml). Bei allen Gruppen zeigte sich so wie zu erwarten eine erhöhte Granulafreisetzung der Thrombozyten nach Aktivierung über Thrombin (0,2 U/ml) im Vergleich zur basalen Expression.

Innerhalb der Kontrollgruppen zeigten sich in der thrombozytären CD62P Expression eine minimal erhöhte Expression bei den Kontrollen ohne ASS im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS, wohingegen in der CD63 und LAMP-1 Expression eine tendenziell leicht höhere Expression bei den Thrombozyten der Kontrollen mit ASS zu verzeichnen war.

In Bezug auf die  $\alpha$ -granuläre Freisetzung nach Stimulation über Thrombin (0,2 U/ml) waren die Thrombozyten der 1.FU ET Patientengruppen mit *JAK2 V617F* Mutation vergleichbar mit den Kontrollgruppen, es wurden keine statistischen Auffälligkeiten erfasst. Die Thrombozyten der ET Patienten mit *CALR* Mutation hingegen zeigten eine

tendenziell leicht-geringere CD62P Expression im Vergleich zu den Kontrollgruppen und den Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation.

Demgegenüber war die lysosomale und  $\delta$ -granuläre Freisetzung der Thrombozyten der 1.FU ET Patientengruppen nach Aktivierung niedriger als die der Kontrollen, verdeutlicht über die verminderte CD63 Fluoreszenzintensität. Statistisch bemerkbar zeigte sich dies in der Patientengruppe mit *JAK2 V617F* Mutation im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (Mann-Whitney test,  $p= 0,0277$ ) und mit ASS (Mann-Whitney test,  $p= 0,0498$ ). Diese verminderte Freisetzung war zusätzlich bei den Thrombozyten der ET Patienten mit *CALR* Mutation im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (Mann-Whitney test,  $p= 0,0070$ ) sowie mit ASS (Mann-Whitney test,  $p= 0,0105$ ) statistisch auffällig.

Die verminderte lysosomale Freisetzung nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten bestätigte sich in der verminderten LAMP-1 Fluoreszenzintensität. Dabei wurde eine statistische Auffälligkeit zwischen den Kontrollen mit ASS im Vergleich zu ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation (unpaired t-Test,  $p= 0,0127$ ) sowie ET Patienten mit *CALR* Mutation (unpaired t-Test,  $p= 0,0408$ ) erfasst.

#### 4.2.1.1.4 Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml) plus Thrombin (0,2 U/ml)

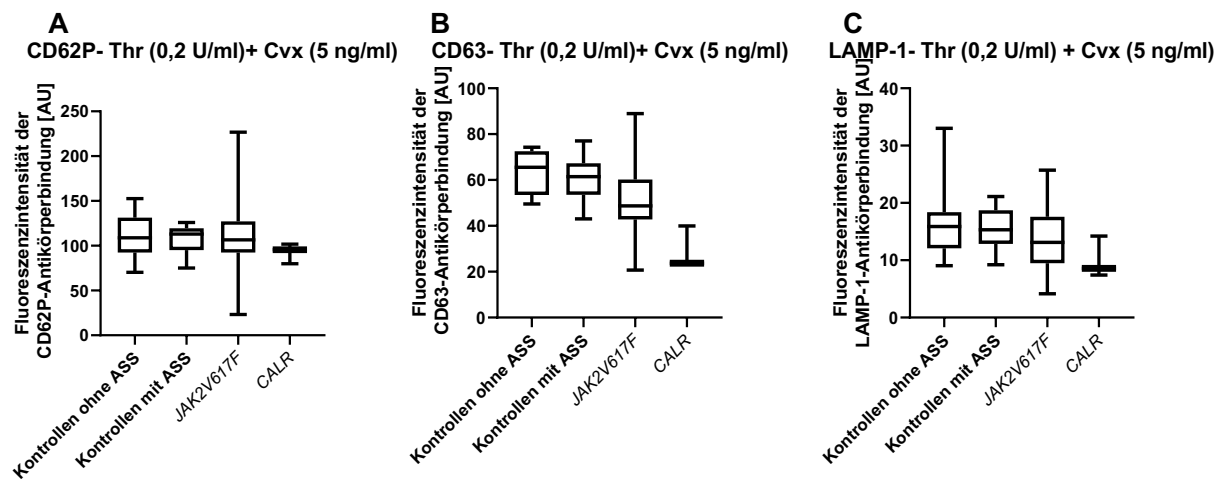


Abbildung 15: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml)+ Thrombin (0,2 U/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Wie bei den Agonisten zuvor, erfolgte auch bei Kombination von Thrombin plus Convulxin eine Agonisten-Titration (Thrombin 0 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml Thrombin 0,025 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml, Thrombin 0,05 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml, Thrombin 0,1 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml, Thrombin 0,2 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml). Auch hier zeigte sich ein sigmoider Kurvenverlauf der Konzentrationskinetik, wobei bei der höchsten Konzentration (Thrombin 0,2 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml) die stärkste Aktivierung beobachtet wurde. Außerdem führte diese simultane Aktivierung der Thrombozyten zu den höchsten Fluoreszenzintensitäten pro Parameter im Vergleich zu der jeweils alleinigen Stimulation.

Die Kontrollen untereinander wiesen unabhängig von der ASS Einnahme eine durchweg vergleichbare thrombozytäre Granulasekretion auf.

Bei isolierter Betrachtung der  $\alpha$ -Granula Freisetzung nach dieser simultanen Aktivierung war die mittlere Fluoreszenzintensität von CD62P der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten vergleichbar mit den Kontrollgruppen, wobei die Thrombozyten der Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation eine große Spannweite aufwiesen.

Hingegen fällt bei allen 1.FU ET Patientengruppen die Expression von CD63 nach gleichzeitiger Aktivierung der Thrombozyten-Agonisten Convulxin (5 ng/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) niedriger aus im Vergleich zu den Kontrollgruppen, am niedrigsten

bei den Thrombozyten der Patienten mit einer *CALR* Mutation. Diese waren statistisch auffällig im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (Mann-Whitney test,  $p=0,0070$ ) sowie mit ASS (Mann-Whitney test,  $p=0,0070$ ).

Auch die LAMP-1 Expression zeigte sich tendenziell niedriger bei den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach der kombinierten Aktivierung, allerdings ergaben sich keine statistischen Auffälligkeiten.

#### 4.2.1.1.5 Vergleich der Expression von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit $Ca^{2+}$ Ionophor ( $20\ \mu M$ )

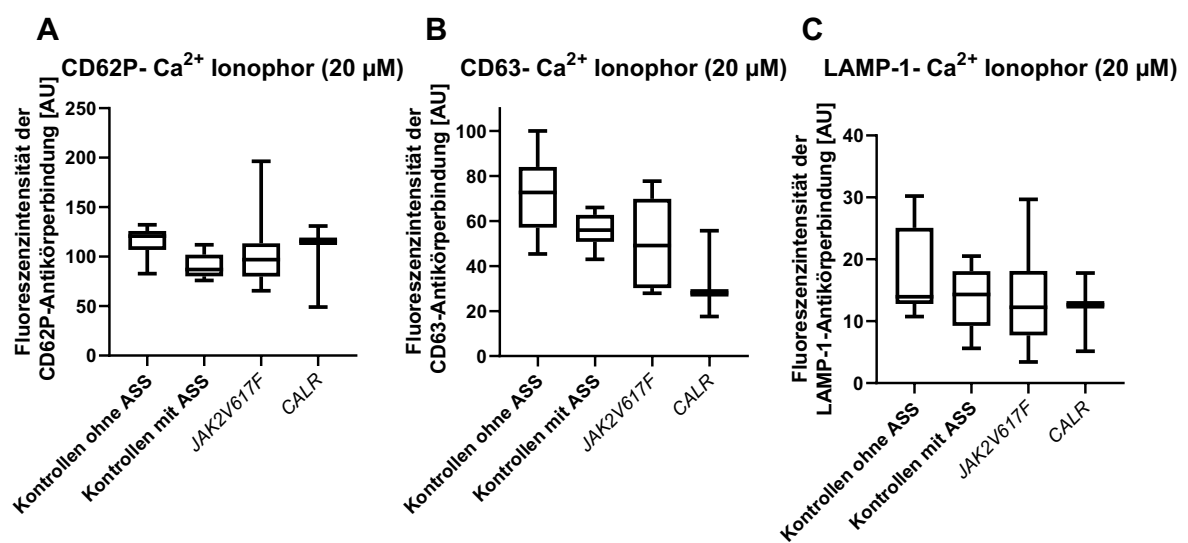


Abbildung 16: Expression von (A) CD62P, (B) CD63 und (C) LAMP-1 nach Aktivierung mit  $Ca^{2+}$  Ionophor ( $20\ \mu M$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Erfolgte eine thrombozytäre Aktivierung mit  $Ca^{2+}$  Ionophor, zeigte sich die CD62P- und CD63- Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten bei den Kontrollen mit ASS niedriger im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Dieser Unterschied war sowohl in der CD62P- (unpaired t-Test  $p=0,0009$ ) als auch in der CD63- (unpaired t-Test  $p=0,0132$ ) Expression statistisch auffällig. Die Thrombozyten der Kontrollgruppen bei Betrachtung der LAMP-1 Expression verhielten sich dagegen vergleichbar.

In Bezug auf die CD62P Expression verhielten sich die Thrombozyten der Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation vergleichbar mit denen der Kontrollen mit ASS. Die der Thrombozyten der Patientengruppe *CALR* hingegen zeigten eine ähnliche Tendenz wie die der Kontrollen ohne ASS.

Die lysosomale und  $\delta$ -granuläre Freisetzung nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor zeichnete sich bei den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten tendenziell vermindert im Vergleich zu den Kontrollgruppen aus. Die statistischen Auffälligkeiten sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 16: Übersicht der p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20  $\mu\text{M}$ ).

	<b>JAK2 V617F</b>	<b>CALR</b>
<b>K- ohne ASS</b>	0,0149	0,0063
<b>K- ASS</b>	0,4141	0,0099
	unpaired t-Test	unpaired t-Test

Bei isolierter Betrachtung der lysosomalen Freisetzung wiesen die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten nur eine tendenziell gering verminderte LAMP-1 Expression auf im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

#### 4.2.1.1.6 Vergleich der CD62P-Expression auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit ADP sowie nach kombinierter Aktivierung mit Convulxin plus ADP bzw. Thrombin plus ADP

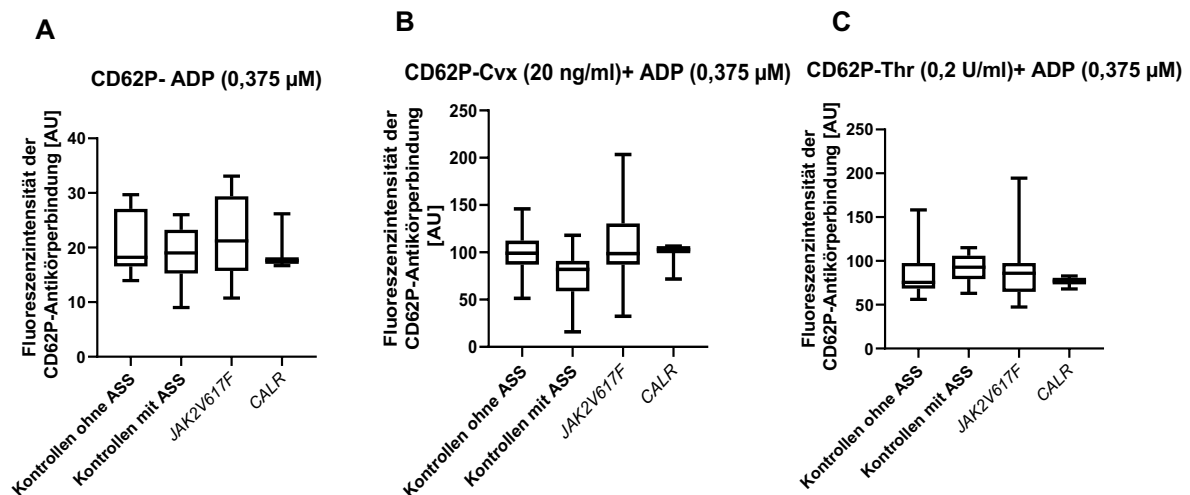


Abbildung 17: Expression von CD62P mit (A) ADP (0,375  $\mu\text{M}$ ) und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml)+ ADP (0,375  $\mu\text{M}$ ) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ ADP (0,375  $\mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F und CALR Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

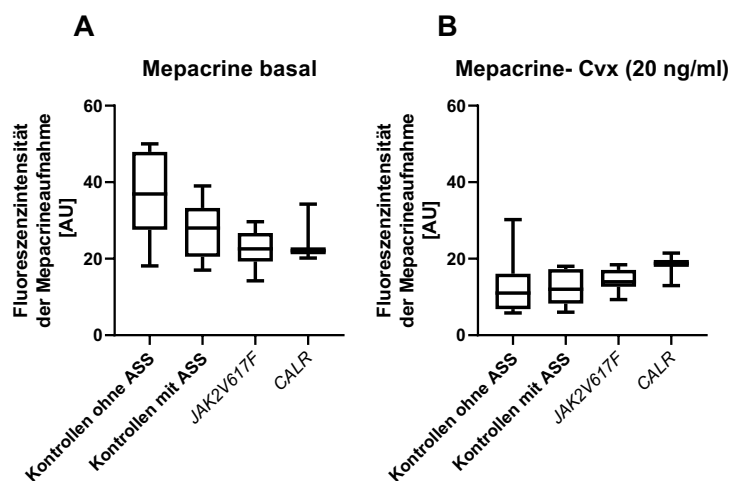
ADP, das aus der  $\delta$ -Granula freigesetzt wird, kann als wichtiger Feedback-Agonist eine  $\alpha$ -Granulasekretion verstärken und kann somit zu einer Differenzierung eines  $\alpha$ -Granula Defektes und  $\delta$ -Granula Defektes ( $\delta$ -SPD) beitragen.

In diesem Assay wurde ADP alleine (0,375  $\mu$ M) sowie in Kombination mit Convulxin (20 ng/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) als thrombozytärer Agonist untersucht. Bei einer alleinigen Stimulation über ADP wurde hierbei bereits eine leichte  $\alpha$ -Granulasekretion induziert, verdeutlicht über die angestiegenen Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur basalen CD62P Expression. Durch die kombinierte Agonistengabe konnte dies noch weiter verstärkt werden.

Die Thrombozyten der Kontrollgruppen wiesen untereinander sowie im Vergleich zu den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten nach einer Aktivierung mit ADP (0, 375  $\mu$ M) alleine und in Kombination mit jeweils Convulxin (20 ng/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) ein vergleichbares Niveau auf.

Abschließend war auffällig, dass bei einem Vergleich der Kontrollgruppen bei einer Stimulation der Thrombozyten mit Convulxin und  $Ca^{2+}$  Ionopher, die thrombozytäre CD62P- und CD63 Expression sensitiv auf ASS reagierte. Dies war nicht der Fall nach einer Thrombin-Stimulierung. Bezüglich der thrombozytären LAMP-1 Expression wurde nur eine leichte ASS-Sensitivität bei  $Ca^{2+}$  Ionophor beobachtet.

#### 4.2.1.2 Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme in die $\delta$ -Granula und Mepacrine-Freisetzung aus den $\delta$ -Granula



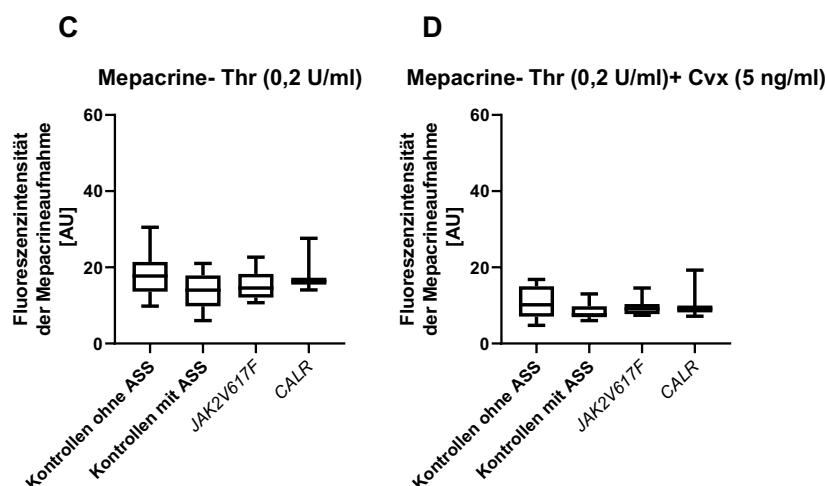


Abbildung 18: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Zur weiteren Analyse der  $\delta$ -Granula diente der Mepacrine Aufnahme/Freisetzungs-Assay. Dabei erlaubte der Basalwert, Aussagen über die Aufnahme von Mepacrine in die  $\delta$ -Granula über eine spezifische Bindung an Adeninnukleotide (ADP und ATP) zu treffen. Die mit Abstand am höchsten erfolgte Aufnahme von Mepacrine zeigte sich bei den Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS. Dies war im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0384$ ) sowie im Vergleich zu den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation (unpaired t-Test,  $p=0,0014$ ) statistisch auffällig. Insgesamt war die Mepacrine Aufnahme bei den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten unabhängig des Mutationsstatus tendenziell vermindert im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Nach der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Freisetzung von ADP und ATP aus den  $\delta$ -Granula und damit auch zu einer Mepacrine Freisetzung, weshalb eine Abnahme der Mepacrine Fluoreszenz bei den detektierten Thrombozyten physiologisch ist. Dies wurde in beiden Kontrollgruppen nach Stimulation mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) sowie nach der kombinierten Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml) + Thrombin (0,2 U/ml) beobachtet. Im Gegensatz dazu sank die Mepacrine Fluoreszenz bei den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten kaum bei der Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml). Erst nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) sowie einer gleichzeitigen Aktivierung mit Convulxin (5 ng/ml) + Thrombin (0,2 U/ml) konnte eine stärkere Fluoreszenzabnahme von Mepacrine erfasst werden. Das hierbei erreichte Fluoreszenzniveau war vergleichbar mit dem der Kontrollgruppen.

#### 4.2.1.3 Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor-Aktivierung (Fibrinogen-, PAC-1-Bindung)

##### 4.2.1.3.1 Vergleich der basalen Bindungskapazität von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa Rezeptor und dessen Aktivierung (PAC-1-AK Bindung)

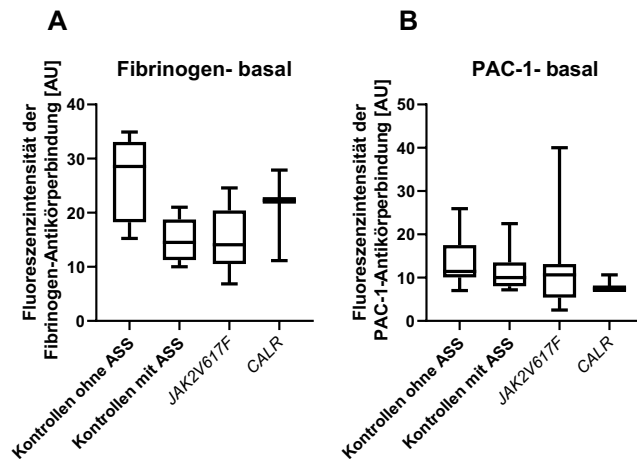


Abbildung 19: Basale Bindung an den GPIIb/IIIa (A) von Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Zur Beurteilung des Aktivierungszustandes des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der thrombozytären Oberfläche wurde die Bindung von Fibrinogen und des PAC-1-Antikörpers bestimmt.

Die Fibrinogen-Bindung an den GPIIb/IIIa Rezeptors im nicht basalen Zustand der Thrombozyten war in der Kontrollgruppe ohne ASS am höchsten. Dieser Unterschied zeigte sich statistisch auffällig im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS (Mann Whitney test,  $p=0,0464$ ), welche eine deutlich niedrigere thrombozytäre Fibrinogen-Bindung aufwies.

Auch die Thrombozyten der 1.FU ET Patientengruppe mit *JAK2 V617F* Mutation banden weniger Fibrinogen im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (statistisch auffällig, unpaired t-Test,  $p=0,0026$ ). Untereinander wiesen die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit einer *CALR* Mutation eine tendenziell höhere Fibrinogen-Bindung im Vergleich zu den Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation auf.

In Bezug auf die PAC-1 Expression im basalen Zustand der Thrombozyten lag die mittlere Fluoreszenzintensität insgesamt in allen untersuchten Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau.

#### 4.2.1.3.2 Vergleich der Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin (0,2 U/ml+ Convulxin 5 ng/ml)

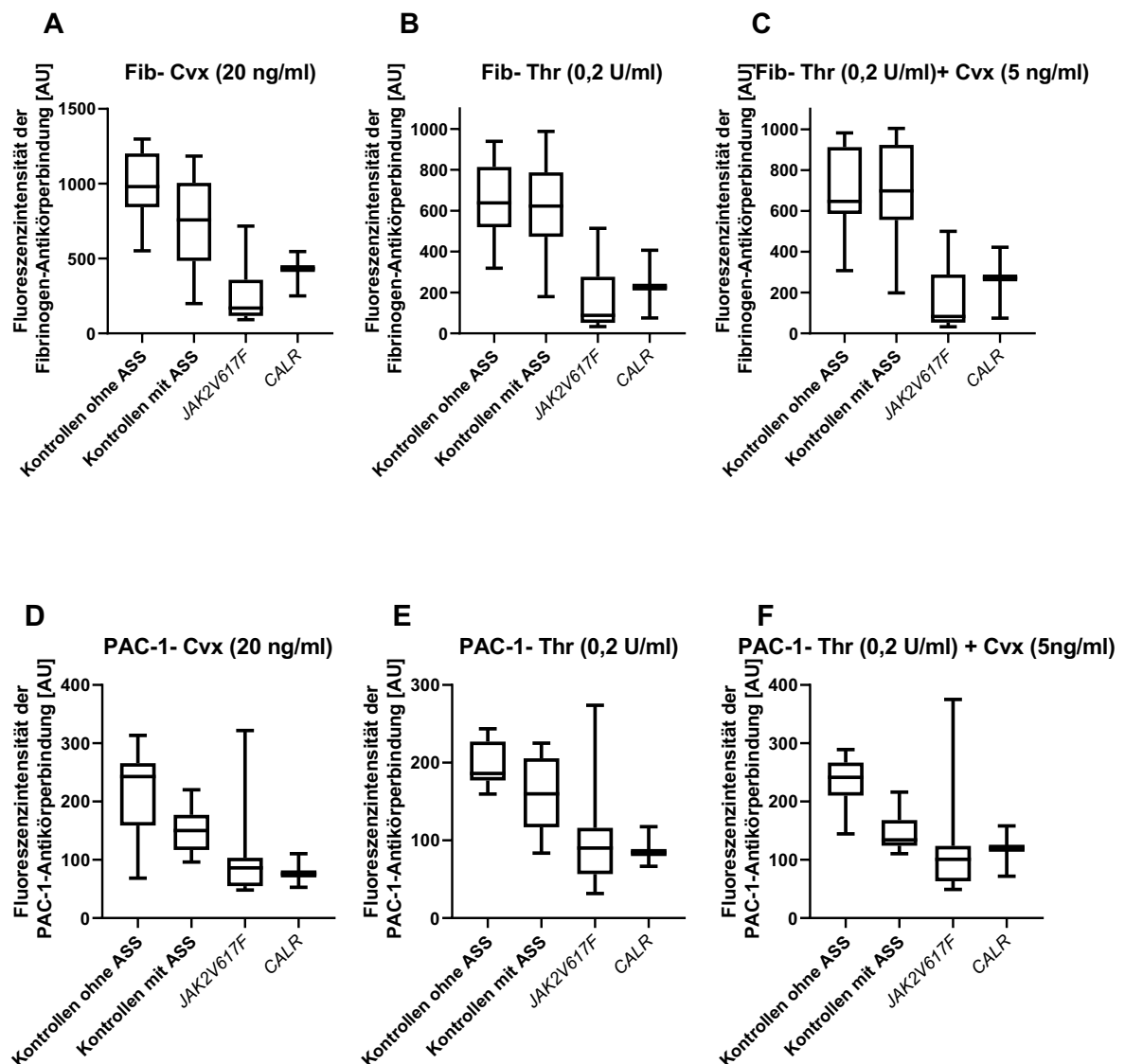


Abbildung 20: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (B) Thrombin (0,2 U/ml) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml). PAC-1-AK Bindung nach Aktivierung mit (D) Convulxin (20 ng/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml) und (F) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Nach einer thrombozytären Aktivierung mittels der Agonisten Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) sowie der Kombination von Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) wurde eine erhebliche Steigerung der Fibrinogen-Bindung an den GPIIb/IIIa Rezeptor in beiden Kontrollgruppen verzeichnet. Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander zeigten die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS nach einer Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml) eine leicht stärkere Fibrinogen-Bindung als die

der Kontrollen mit ASS. Nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) und dessen Kombination mit Convulxin (0,2 U/ml+ 5 ng/ml) verhielten sich die Thrombozyten der Kontrollen vergleichbar. Im Gegensatz dazu war die Fibrinogen-Bindung auf den Thrombozyten der ET Patienten im 1.FU durchweg geringer, wobei die ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation die niedrigste Bindung aufwiesen. Die statistisch auffälligen Unterschiede sind in nachfolgender Tabelle 16 aufgeführt.

Wie die Fibrinogen-Bindung ist auch die PAC-1 Bindung in den Kontrollgruppen nach Aktivierung stark erhöht im Vergleich zur basalen Aktivität. Darüber hinaus banden die Kontrollen ohne ASS nach Aktivierung mit Convulxin (unpaired t-Test,  $p=0,0275$ ), Thrombin (unpaired t-Test,  $p=0,0365$ ) sowie Thrombin+ Convulxin (unpaired t-Test,  $p=0,0002$ ) mit einer statistischen Auffälligkeit mehr PAC-1 an aktiviertes GPIIb/IIIa als die Kontrollen mit ASS. Die verminderte Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der thrombozytären Oberfläche der 1.FU ET Patienten bestätigte sich ebenfalls in der Auswertung der Bindung von PAC-1. Nach Aktivierung mit denselben obengenannten Agonisten zeigte sich auch hier eine niedrigere PAC-1 Bindung bei den Thrombozyten der 1.FU ET Patienten, die unabhängig der Mutation insgesamt eine einheitliche mittlere Bindung aufwiesen (siehe Tabelle 17). Auffällig jedoch war, dass ein Patient mit einer *JAK2 V617F* Mutation eine deutlich erhöhte PAC-1 Bindung zeigte, die vergleichbar war mit der der Kontrollen ohne ASS.

Tabelle 17: Übersicht der p-Werte nach thrombozytärer Fibrinogen-Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml).

	<i>JAK2 V617F</i>			<i>CALR</i>		
	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+Cvx 5 ng/ml	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+Cvx 5 ng/ml
<b>K- ohne ASS</b>	0,0002 Mann- Whitney test	0,0002 Mann- Whitney test	0,0002 Mann-Whitney test	0,0044 unpaired t-Test	0,0113 unpaired t-Test	0,0158 unpaired t-Test
<b>K- mit ASS</b>	0,0004 Mann- Whitney test	0,0005 Mann- Whitney test	0,0001 Mann-Whitney test	0,0914 unpaired t-Test	0,0238 unpaired t-Test	0,0158 unpaired t-Test

Tabelle 18: Übersicht der p-Werte der thrombozytären PAC-1 Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml).

	<b>JAK2 V617F</b>			<b>CALR</b>		
	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+Cvx 5 ng/ml	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+Cvx 5 ng/ml
<b>K- ohne ASS</b>	0,0006 Mann- Whitney test	0,0007 unpaired t-Test	0,002 Mann-Whitney test	0,0111 unpaired t-Test	0,0002 unpaired t-Test	0,0022 unpaired t-Test
<b>K- ASS</b>	0,0003 Mann- Whitney test	0,0428 unpaired t-Test	0,0161 Mann-Whitney test	0,192 unpaired t-Test	0,0440 unpaired t-Test	0,2165 unpaired t-Test

#### 4.2.1.3.3 Vergleich der Aktivierung des thrombozytären GPIIb/IIIa Rezeptors nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor 20 µM

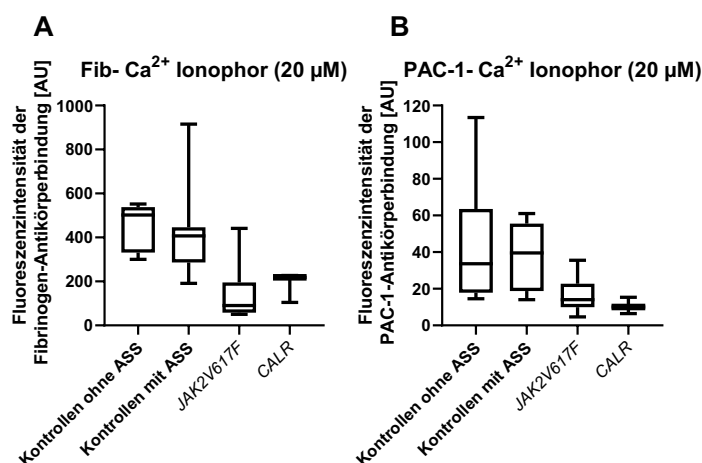


Abbildung 21: Bindung an den GPIIb/IIIa (A) von Fibrinogen (Fib) und (B) PAC-1 nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F und CALR Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Sowohl die thrombozytäre Fibrinogen-Bindung als auch die thrombozytäre PAC-1 Bindung zeigten sich nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophore (20µM) bei den Kontrollen ohne ASS höher als bei den Kontrollen mit ASS.

Die Thrombozyten der 1.FU ET Patientengruppen wiesen eine verminderte Fibrinogen-Bindung und PAC-1 Bindung auf. Während die Thrombozyten der ET Patienten mit JAK2 V617F Mutation die niedrigste Fibrinogen-Bindungskapazität

aufwiesen, war die thrombozytäre PAC-1 Bindung der 1.FU ET Patienten unabhängig der Mutation- und Therapiegruppe ähnlich niedrig.

Tabelle 19: Übersicht der p-Werte nach thrombozytärer Fibrinogen-Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20  $\mu\text{M}$ ).

	<b>JAK2 V617F</b>	<b>CALR</b>
<b>K- ohne ASS</b>	0,0004 Mann-Whitney test	0,0091 Mann-Whitney test
<b>K- ASS</b>	0,0030 Mann-Whitney test	0,0364 Mann-Whitney test

Tabelle 20: Übersicht der p-Werte der thrombozytären PAC-1 Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20  $\mu\text{M}$ ).

	<b>JAK2 V617F</b>	<b>CALR</b>
<b>K- ohne ASS</b>	0,0183 unpaired t-Test	0,1161 unpaired t-Test
<b>K- ASS</b>	0,0035 unpaired t-Test	0,0289 unpaired t-Test

Zusammenfassend war auffällig, dass bei Betrachtung der Kontrollgruppen die Aktivierung der Thrombozyten mit Convulxin eine ASS sensitive Bindung von Fibrinogen und PAC-1 zu verzeichnen war, wohingegen dies nach Aktivierung mit Thrombin und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor nicht der Fall war.

Bezüglich des Fibrinogen-Assays ist noch anzumerken, dass über den Zeitraum der stattgefundenen Untersuchungen verschiedene Fibrinogen-Chargen verwendet wurden, die wahrscheinlich zu den variablen maximalen Fluoreszenz-Intensitäten der detektierten Thrombozyten führten.

#### 4.2.1.4 Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung *ex vivo* und nach Stimulierung *in vitro*

##### 4.2.1.4.1 Vergleich der thrombozytären basalen VWF-Bindung sowie Aktivierung des GPIIb $\alpha$ Rezeptors nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml)

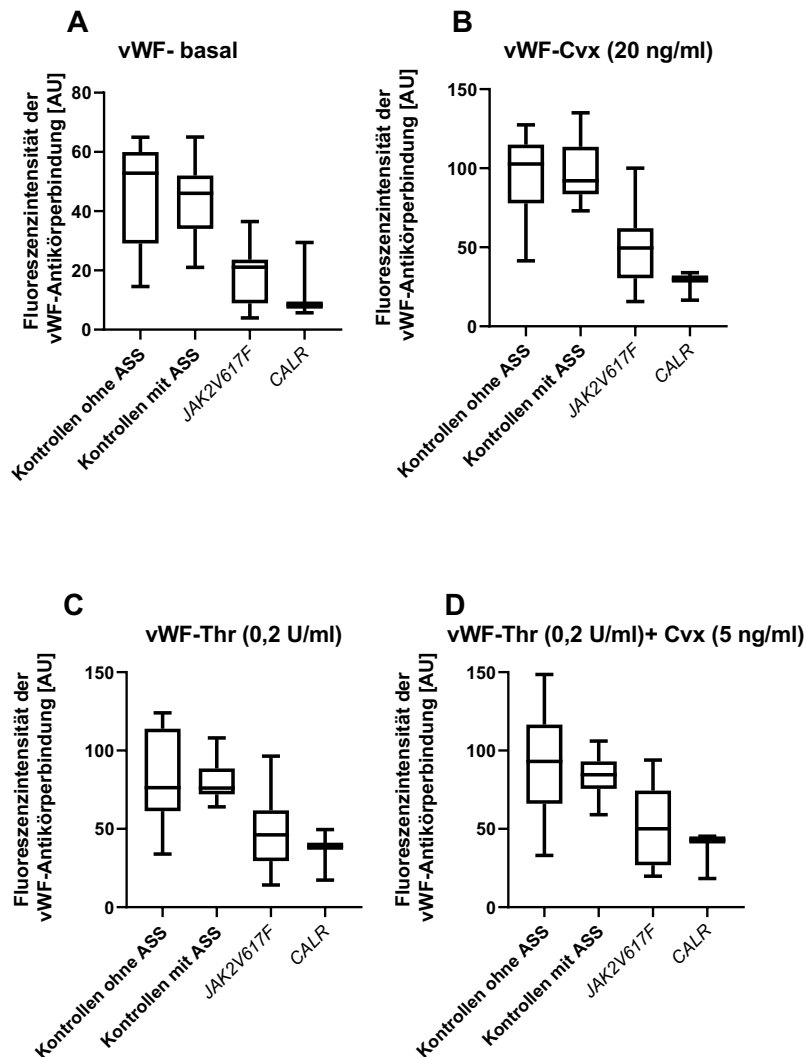


Abbildung 22: Bindung von vWF (A) basal und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F und CALR Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Im basalen Zustand war die VWF Bindung an die Thrombozyten primär über GPIIb $\alpha$  innerhalb der Kontrollgruppen bei der Kontrolle ohne ASS tendenziell leicht höher als die mit ASS. Demgegenüber war die VWF Bindung der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten insgesamt gering; am geringsten bei den Thrombozyten der ET Patienten mit CALR Mutation. Letzteres zeigte im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0193$ ) und mit ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0077$ ) eine statistische

Auffälligkeit. Ebenso waren die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0005$ ) sowie mit ASS (unpaired t-Test,  $p=0,0002$ ) statistisch auffällig.

Nach Stimulation der Thrombozyten mittels der Agonisten Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) sowie der Kombination von Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) fand eine vermehrte VWF Bindung an die Thrombozyten-Oberfläche der Kontrollgruppen statt. Sowohl nach alleiniger Aktivierung mit Convulxin als auch in Kombination mit Thrombin zeigten die Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS eine tendenziell höhere VWF Bindung als die der Kontrollen mit ASS. Bei alleiniger Aktivierung mit Thrombin wiesen die Kontrollgruppen untereinander eine vergleichbare VWF Bindung auf. Im Vergleich dazu war die Bindung an GPIIb/IIIa über den VWF bei den Thrombozyten der ET Patienten im 1.FU weiterhin geringer. Dabei erreichte die VWF-Bindung der ET Patientengruppen unabhängig des Mutationstatus ähnliche Fluoreszenzintensitäten.

Tabelle 21: Übersicht der p-Werte der thrombozytären VWF Bindung im Vergleich zwischen den ET Patienten zu den Kontrollgruppen nach Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin plus Convulxin (0,2 U/ml plus 5 ng/ml).

	<b>JAK2 V617F</b>			<b>CALR</b>		
	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+ Cvx 5 ng/ml	Cvx 20 ng/ml	Thr 0,2 U/ml	Thr 0,2U/ml+Cvx 5 ng/ml
<b>K- ohne ASS</b>	0,0009 unpaired t-Test	0,0142 unpaired t-Test	0,0122 unpaired t-Test	0,0016 unpaired t-Test	0,0323 unpaired t-Test	0,0249 unpaired t-Test
<b>K- ASS</b>	0,0002 unpaired t-Test	0,0024 unpaired t-Test	0,0068 unpaired t-Test	0,0001 unpaired t-Test	0,0010 unpaired t-Test	0,0008 unpaired t-Test

#### 4.2.1.4.2 Vergleich der thrombozytären VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin 1 mg/ml

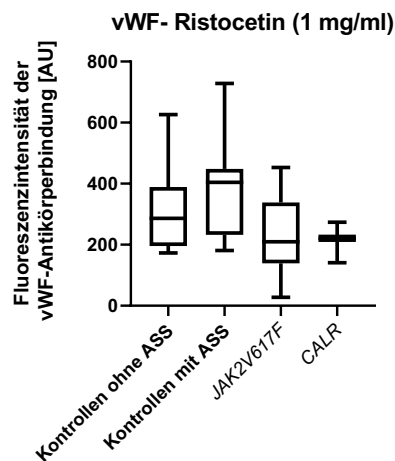


Abbildung 23: Bindung von VWF nach Aktivierung mit Ristocetin (1mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Durch Stimulation der Thrombozyten mit Ristocetin (1 mg/ml), dem stärksten Agonisten, der die VWF Bindung and Thrombozyten induziert, wurde im Vergleich zu den anderen Agonisten erwartungsgemäß die höchste VWF Bindung erreicht.

Innerhalb der Kontrollgruppen wiesen die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS tendenziell eine höhere VWF Bindung auf als die Kontrollen ohne ASS.

Insgesamt war die thrombozytäre VWF Bindung der Kontrollgruppen höher als die der 1.FU ET Patienten, wobei die Kontrollen mit ASS tendenziell die höchste Bindung aufwiesen. Diese zeigten im Vergleich zu den Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation eine statistische Auffälligkeit (unpaired t-Test,  $p=0,0241$ ). Innerhalb der 1.FU ET Patienten wurde untereinander eine vergleichbare Ristocetin-induzierte VWF-Bindung an die Thrombozyten beobachtet.

In Bezug auf die Ergebnisse des VWF-Assays ist anzumerken, dass im Verlauf der Studie eine andere VWF-Antikörper-Charge eingesetzt wurde, die durchschnittlich zu verminderten Fluoreszenzsignalen der Thrombozyten bei einigen Kontrolle ohne ASS und bei vereinzelt ET-Patienten führte.

## 4.2.1.5 Vergleich der PDI Oberflächenexpression auf den Thrombozyten

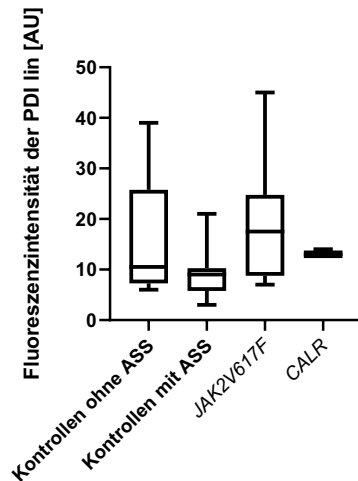


Abbildung 24: Mittlere Fluoreszenzintensität der PDI auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der PDI Expression auf der thrombozytären Oberfläche wies innerhalb der Kontrollgruppen ein vergleichbares Niveau auf.

Insgesamt zeigten die Thrombozyten der ET Patienten im 1.FU eine höhere PDI Expression im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Am höchsten wurde PDI auf der Oberfläche der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten Patienten mit *JAK2* V617F Mutation exprimiert und am niedrigsten bei den Kontrollen mit ASS. Dieser Unterschied bestätigte sich als statistische Auffälligkeit (unpaired t-Test,  $p=0,0093$ ).

#### 4.2.1.6 Vergleich der Analyse des mitochondrialen Membranpotentials der Thrombozyten mithilfe von JC-1

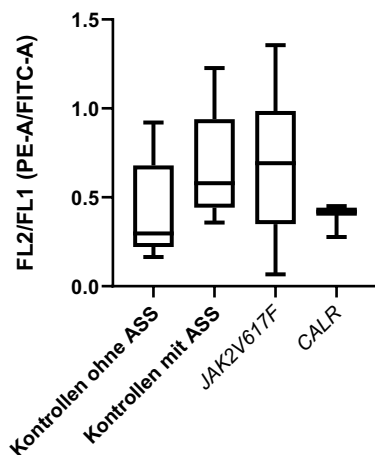


Abbildung 25: Quotientendarstellung von JC-1 der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Boxplotdarstellung mit Mittelwert und 95%-5%- Wert pro Gruppe.

In Abbildung 25 ist der Quotient aus der rötlichen Fluoreszenz-Emission von JC-1 (FL2 bzw. PE-A) zu der grünen Fluoreszenzemission von JC-1 (FL1 bzw. FITC-1) der untersuchten Gruppen angegeben. Eine Erhöhung des Quotienten entsprach einer Erhöhung der rötlichen Fluoreszenz von JC-1 und damit einer erhöhten Konzentration an JC-1 Aggregaten. Dies wiederum widerspiegelte eine Erhöhung des MMP und damit einer Hyperpolarisation der inneren mitochondrialen Membran. Analog entsprach eine Verschiebung des Quotienten zugunsten der grünen Fluoreszenz einer Verminderung des MMP und einer Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran.

In Bezug auf die Kontrollgruppen wurden bei den Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS ein niedrigeres MMP im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS registriert. Dies erwies sich außerdem als statistisch auffällig (Mann-Whitney test,  $p=0,0400$ ).

Das höchste MMP wies insgesamt die Thrombozyten der 1.FU ET Patientengruppe mit *JAK2 V617F* Mutation auf. Die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit *CALR* Mutation zeigten ein vergleichbares MMP wie die Kontrollen ohne ASS.

#### 4.2.2 Intra-individueller Vergleich der Thrombozytenfunktion– Einschluss vs. 1.FU

In der folgenden Auswertung wurde die Thrombozyten-Funktion im direkten Vergleich zwischen den ET-Patienten im Ersteinschluss und deren Folgeuntersuchung (1.FU) nach einem Jahr aufgetragen. Die Untersuchung zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses wurden von Frau Charlotte H. in einer weiteren Dissertation in der AG von Frau Dr. Kerstin Jurk durchgeführt und freundlicherweise für den direkten Vergleich zum 1.FU zur Verfügung gestellt. In folgender Analyse wurden die einzelnen Patienten farblich markiert und eine Farbnuance entsprach der zugehörigen Mutations- und Therapiegruppe (*JAK2 V617F+HU*, *JAK2 V617F-HU*, *CALR+HU*). Außerdem wurde als Kontrollreferenz der jeweilige Mittelwert der Kontrollen mit ASS (K-mit ASS) und ohne ASS (K-ohne ASS) des untersuchten Parameters mit dargestellt. Anzumerken ist, dass in diesem direkten Vergleich neun der 13 Patienten berücksichtigt wurden. Grund hierfür ist, dass bei diesen keine Veränderungen in zytoreduktiver Therapie und Krankheitsprogress aufgetreten sind.

Die restlichen vier Patienten (P9, P10, P12, P13) wurden gesondert ausgewertet, da es bei denen innerhalb des 1.FU zu einem Therapiewechsel kam, wovon zwei (P9, P10) auf Anagrelid und einer (P12) auf Interferon-alpha umstiegen. P13 hingegen setzte die zytoreduktive Therapie komplett ab. Bei letzterem und auch bei dem Patienten P9 wurde darüber hinaus im Laufe des 1.FU eine Post-ET-MF diagnostiziert.

4.2.2.1 Vergleich der Thrombozytenfunktion bei 1.FU ET Patienten ohne klinische und therapeutische Veränderungen

4.2.2.1.1 Vergleich der thrombozytären  $\alpha$ -Granula-Freisetzung

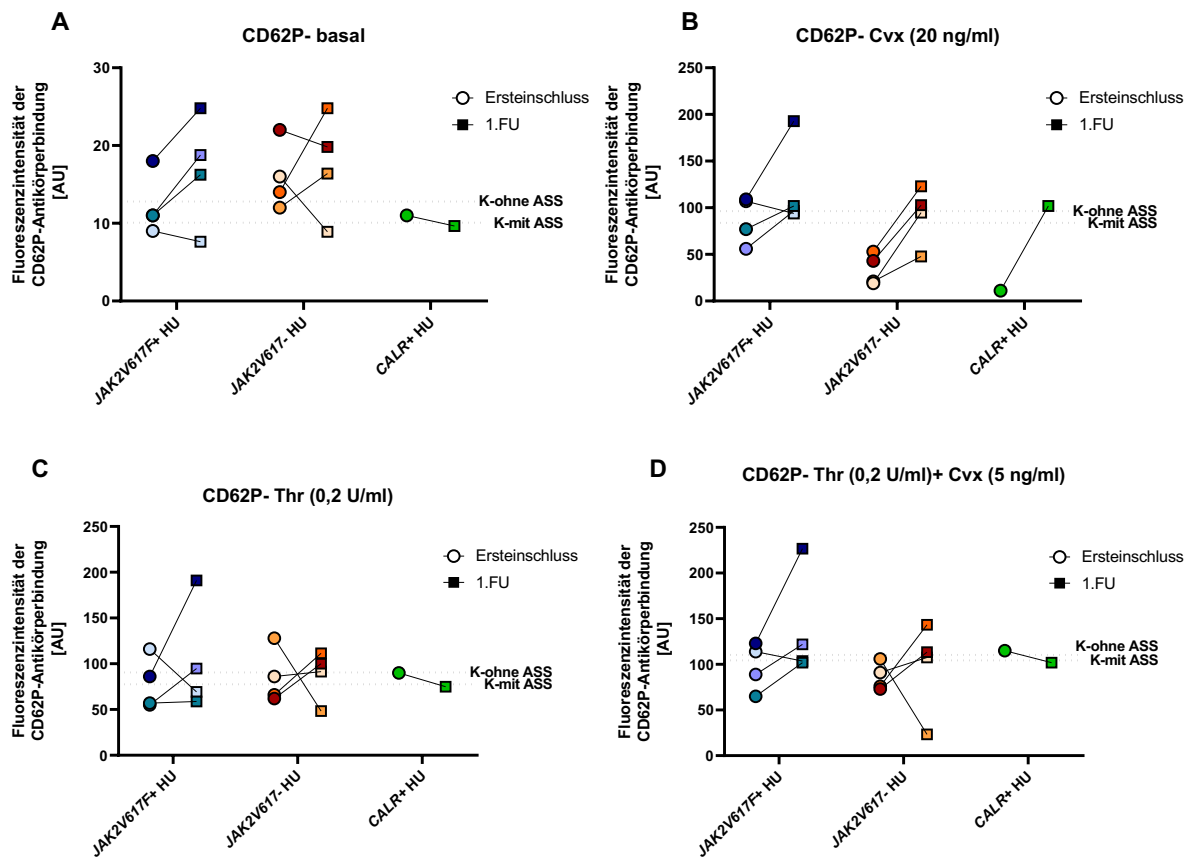


Abbildung 26: CD62P Expression (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende:

ES: P1: P2: P3: P4: P5: P6: P7: P8: P11: K-ohne ASS  
 1.FU: P1: P2: P3: P4: P5: P6: P7: P8: P11: K-mit ASS

Bei Betrachtung der basalen Expression von CD62P zeigte sich diese im 1.FU in der Mehrheit der Patienten tendenziell steigend im Vergleich zur Erstuntersuchung, wodurch sie überwiegend oberhalb beider Referenzniveaus lag. Eine Ausnahme bildete der Patient P6 (*JAK2 V617F-HU*), welcher eine entgegengesetzte und zugleich Kontrollreferenzen unterschreitende Tendenz im 1.FU aufwies. Verhältnismäßig konstant niedrige Expressionswerte von CD62P wiesen die Patienten P2 (*JAK2 V617F+HU*) und P11 (*CALR+HU*) auf.

Nach einer Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml) wurde eine konsequente Steigerung der Expression von P-Selektin auf der thrombozytären Oberfläche der ET-Patienten im 1.FU in allen Patientengruppen beobachtet. Da diese zum Zeitpunkt der

Erstuntersuchung überwiegend unterhalb der Kontrollreferenzen lag, wurde im 1.FU so eine Annäherung beziehungsweise Überschreitung (P4, P3, P7, P8, P11) des Niveaus der Kontrollreferenzen erreicht.

Hingegen nach einer Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) reagierten die Thrombozyten im 1.FU sehr verschieden: In den Patientengruppen mit einer *JAK2 V617F* Mutation (*JAK2 V617F+HU* und *JAK2 V617F-HU*) war die CD62P Expression entweder erhöht, konstant bleibend oder vermindert im Vergleich zu dem entsprechenden Ersteinschluss. Exemplarisch war die Steigerung der CD62 Expression bei den Patienten P4 (*JAK2 V617F+HU*) und P7 (*JAK2 V617F-HU*) so hoch, dass die Kontrollreferenzen überschritten wurde, wohingegen bei den Patienten P2 (*JAK2 V617F+HU*) und P5 (*JAK2 V617F-HU*) dies der umgekehrte Fall war mit einer Unterschreitung der Kontrollreferenzen zur Folge.

Der Patient der *CALR+HU*-Gruppe (P11) dagegen zeigte eine leicht verminderte Expression von CD62P: Lag diese im Ersteinschluss noch auf dem Niveau der Kontrollreferenz ohne ASS, so fiel diese im 1.FU auf das Niveau der Kontrollreferenz mit ASS.

Wurden die Thrombozyten mit Convulxin (5 ng/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) simultan stimuliert, ergab sich ein vergleichbares Bild wie nach der alleinigen Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml).

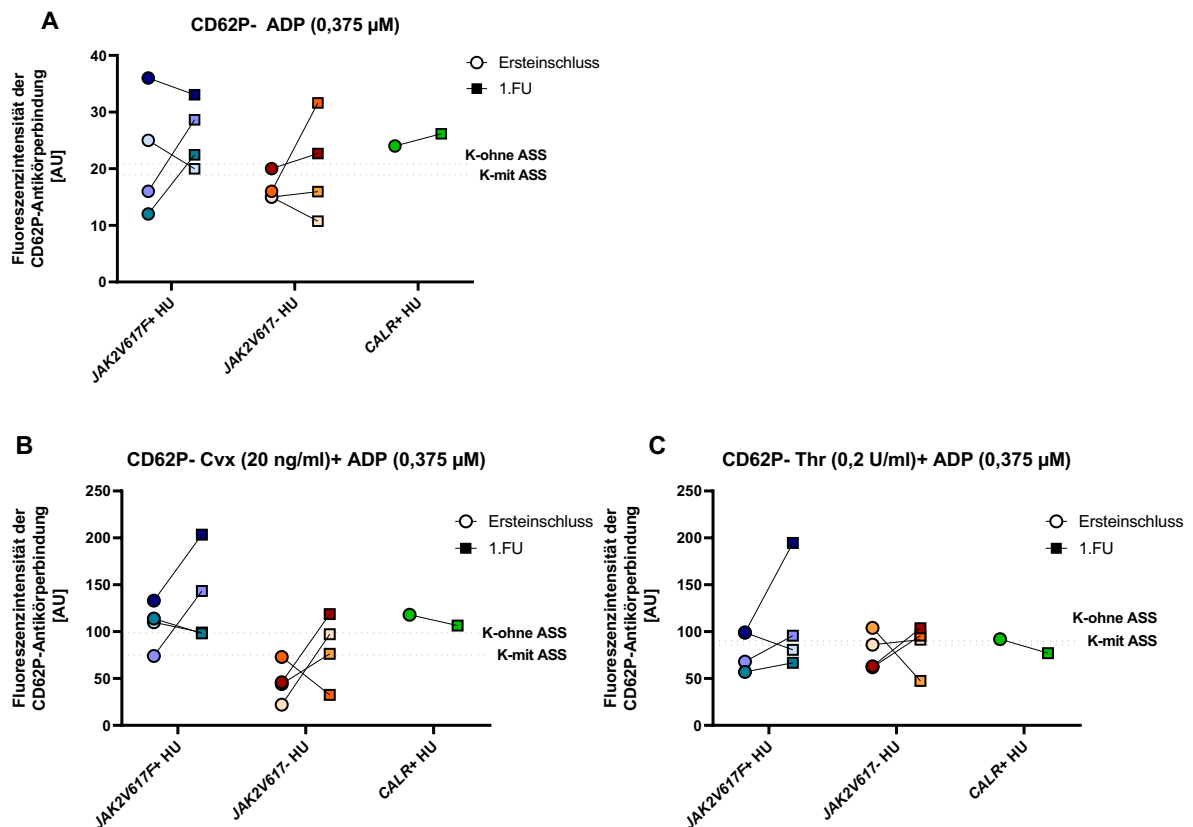


Abbildung 27: CD62P Expression nach Aktivierung mit (A) ADP (0,375 µM), (B) Convulxin (20 ng/ml)+ ADP (0,375 µM) und (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ ADP (0,375 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F+ HU, JAK2 V617F- HU und CALR+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, ADP: Adenosindiphosphat. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ○ P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Auch nach einer Stimulation der Thrombozyten über die ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> war die CD62P Expression in den Patientengruppen in der 1.FU Untersuchung verschieden. Die Majorität der Patienten zeigte eine gleichbleibende bis tendenziell vermehrte Expression von CD62P. Bei den Patienten mit erhöhter CD62P Expression (P1, P3, P7, P8) resultierte die Steigerung im 1.FU in einem Überschreiten der Kontrollreferenzen mit ASS (K-mit ASS) und ohne ASS (K-ohne ASS).

Kombinierte man die Agonisten ADP (0,375 µM) und Convulxin (20 ng/ml) zeigten die Patienten ebenfalls überwiegend eine steigende Tendenz der α-Granula-Freisetzung, wodurch das Niveau der Kontrollreferenz K-ohne ASS erreicht beziehungsweise überschritten (P1, P8) wurde. Der Patient P7 hingegen war die Ausnahme und wies eine entgegengesetzte Tendenz auf, sodass dieser das niedrigste Expressionsniveau der Patienten im 1.FU hatte.

Wurden die Thrombozyten hingegen mit ADP (0,375  $\mu$ M) und Thrombin (0,2 U/ml) aktiviert, war dies vergleichbar mit dem Ergebnis nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) allein.

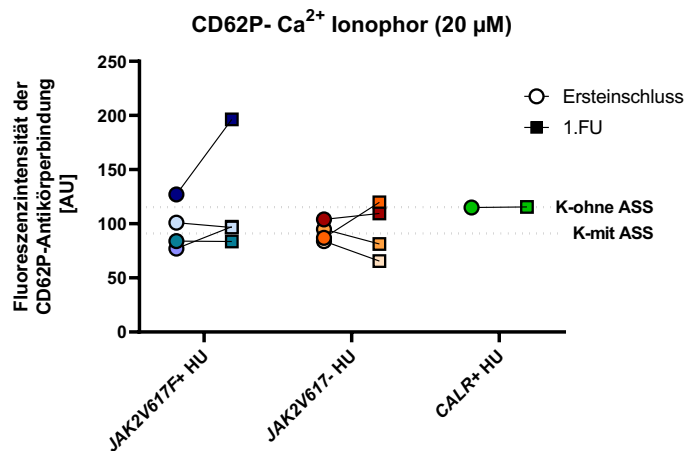


Abbildung 28: CD62P Expression nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20  $\mu$ M) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F+ HU, *JAK2* V617F- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ○ P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Durch eine Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophore (20  $\mu$ M) blieb bei der Mehrheit der 1.FU Patienten, mit Ausnahme des Patienten P4, die CD62P Expression im Vergleich zum Ersteinschluss tendenziell konstant, sodass sich das Expressionsniveau weiterhin um das der Kontrollen mit ASS (K-mit ASS) und ohne ASS (K-ohne ASS) einpendelte.

Zusammenfassend war bei dem CD62P-Assays auffällig, dass die CD62P Expression des Patienten P4 unter HU Therapie mit seinen hohen Werten stark aufgefallen ist und sich diese im Laufe des 1.FU nahezu verdoppelt hatte und somit im Vergleich zu den anderen Patienten aber auch der Kontrollreferenzen deutlich höher war. Im Gegensatz dazu stachen die Patienten P2 und P5 durch gehäuft niedrige CD62P Expressionsniveaus hervor.

#### 4.2.2.1.2 Vergleich der thrombozytären lysosomalen- und $\delta$ -Granula-Freisetzung (CD63, LAMP-1- Oberflächenexpression)

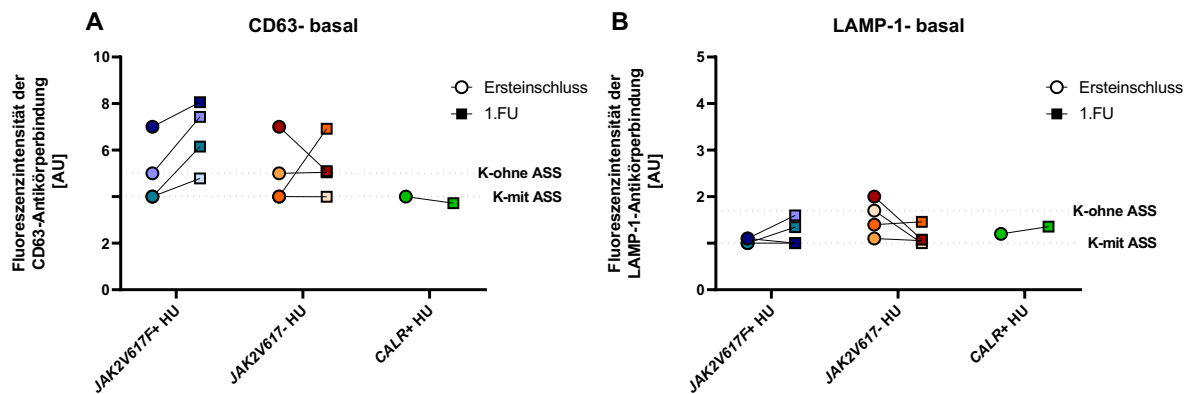


Abbildung 29: basale Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ○ P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Im Vergleich zur Voruntersuchung zeigte die Mehrheit der Patienten im 1.FU eine tendenziell vermehrte bis konstant bleibende Expression von sowohl CD63 als auch LAMP-1, mit Ausnahme der Patienten P8 (*JAK2 V617F-HU*) und P11 (*CALR+HU*), die eine entgegengesetzte Tendenz aufwiesen. blieb dabei die LAMP-1 Expression aller 1.FU Patienten zwischen dem Niveau der Kontrollreferenzen, kam es bei der Hälfte der Patienten zu einem Überschreiten der Kontrollreferenz ohne ASS in Bezug auf die CD63 Expression.

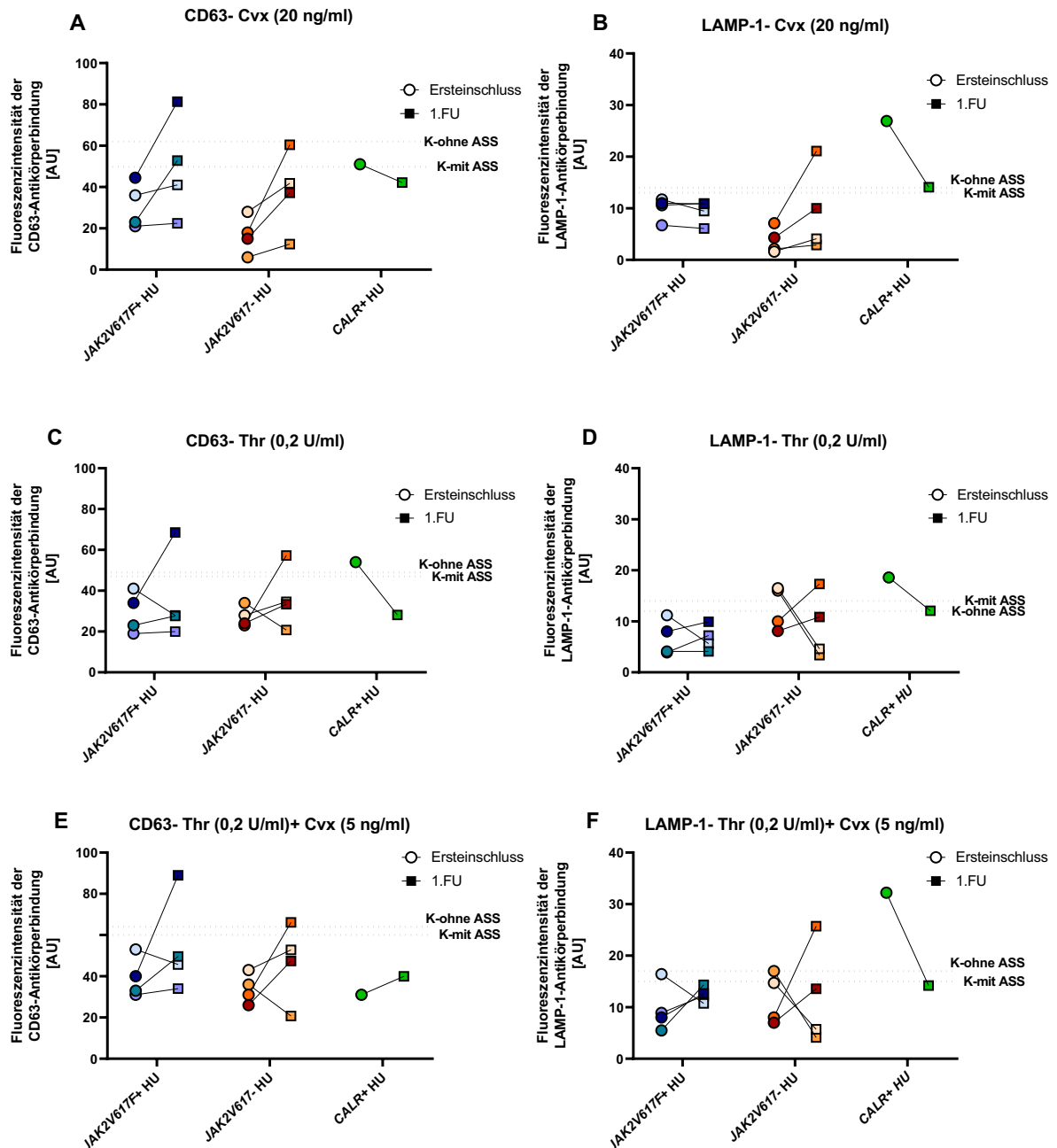


Abbildung 30: CD63 Expression nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F + HU, *JAK2* V617F- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). LAMP-1 Expression nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F+ HU, *JAK2* V617F- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden (angegeben ist der Mittelwert) mit bzw. ohne ASS. Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ○ P4: ● P5: ● P6: ○ P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Erfolgte eine Stimulation der Thrombozyten mit dem GPVI Agonisten Convulxin (20 ng/ml), ergaben die Auswertungen der Expression von CD63 und LAMP-1 in der FU-Untersuchung vergleichbare Ergebnisse: Die Mehrheit der Patienten mit einer *JAK2*

V617F Mutation zeigten eine vermehrte lysosomale und  $\delta$ -granuläre Freisetzung, wodurch bei zwei dieser Patienten (P4, P7) beide Kontrollreferenzen (K-mit ASS, K-ohne ASS) überschritten wurden. Demgegenüber wurde bei dem Patienten der Gruppe CALR+HU (P11) eine Verringerung des Expressionsniveaus mit Annäherung (LAMP-1) an die Kontrollreferenzen beziehungsweise Unterschreiten (CD63) dergleichen beobachtet.

Bei einer Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) und der Kombination von Convulxin+Thrombin (5 ng/ml+ 0,2 U/ml) zeigte sich eine vergleichbare Entwicklung wie nach alleiniger Aktivierung über Convulxin, mit einem wesentlichen Unterschied: Die Patienten P2 (*JAK2* V617F+HU), P5 und P6 (*JAK2* V617F-HU) wiesen wie der Patient P11 zuvor nun ebenfalls eine Kontrollreferenz unterschreitende Verringerung der LAMP-1 Expression auf.

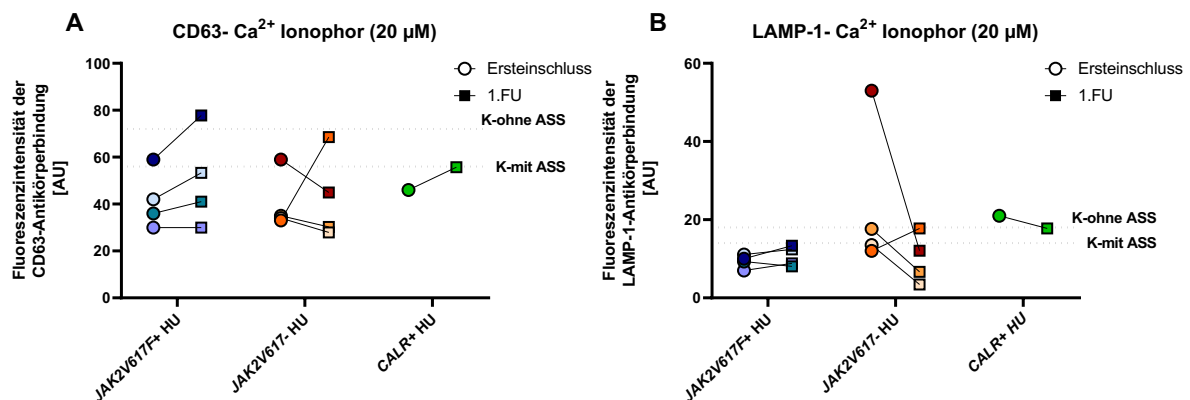


Abbildung 31: Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20  $\mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F+ HU, *JAK2* V617F- HU und CALR+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ● P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Nach einer thrombozytären Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20  $\mu\text{M}$ ) konnte in den Patientengruppen mit einer HU Therapie eine nahezu konstant bleibende CD63 und LAMP-1 Expression im 1.FU verzeichnet werden. Die Patienten der Gruppe *JAK2* V617F-HU hingegen zeigten mit Ausnahme des Patienten P7 eine tendenzielle Verringerung, was besonders eindrücklich bei dem Patienten P8 (LAMP-1) zu erkennen war.

Trotz der tendenziell vermehrten Freisetzung der Lysosomen und  $\delta$ -Granula in der 1.FU-Untersuchung im Vergleich zum Ersteinschluss konnte das Niveau der Kontrollreferenzen zwar angenähert werden, blieb jedoch mehrheitlich weiterhin

darunter. Wie auch im CD62P-Assay stach der Patient P4 im CD63-Assay durch seine auffallende, Kontrollreferenzen übersteigende Steigerung der CD63 Expression hervor. Bezüglich der LAMP-1 Expression kam der Patient P7 mit auffallend steigenden Tendenzen hinzu, wohingegen die Patient P5 und P11 mit fallenden Tendenzen auffielen.

#### 4.2.2.1.3 Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung

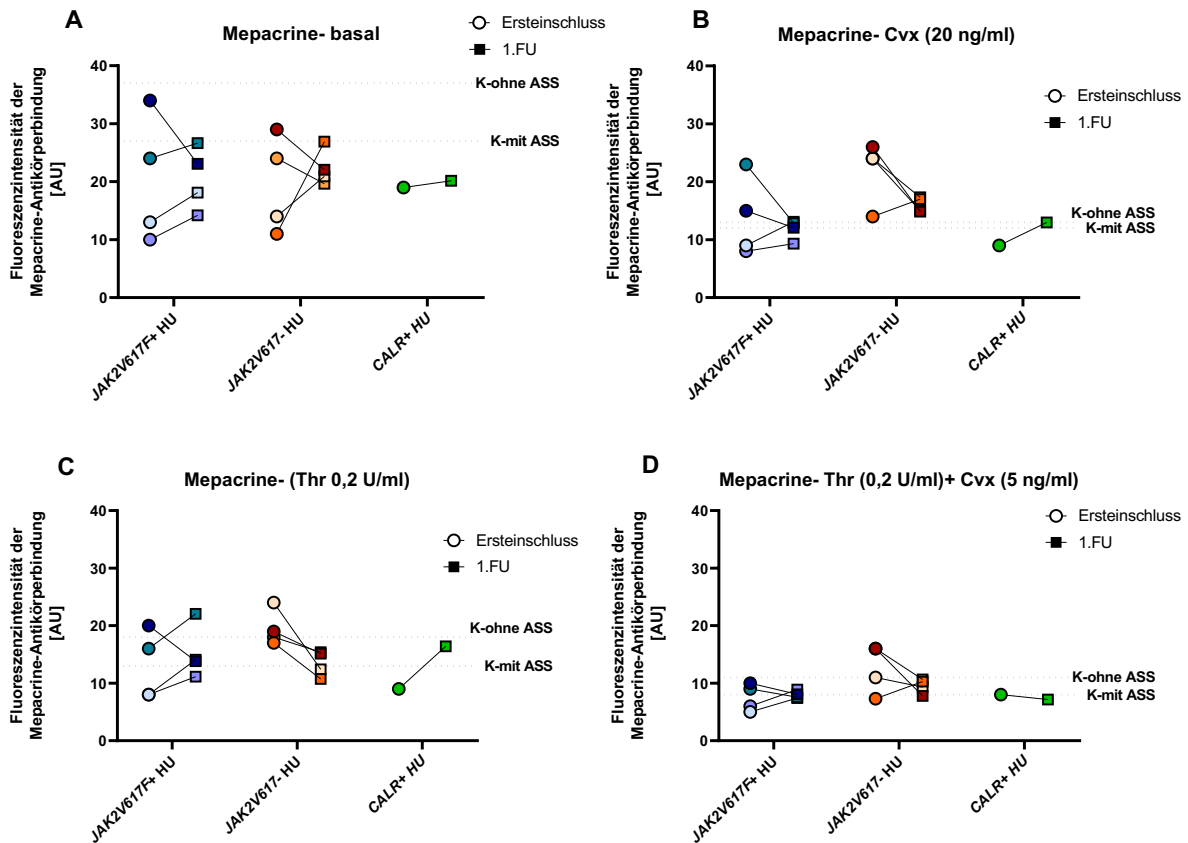


Abbildung 32: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (C) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS. Abkürzungen: K-ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert): Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ● P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Zur Beurteilung der Gesamtheit des Mepacrine-Assays wird die Mepacrine Freisetzung in Relation zur Mepacrine Aufnahme gesetzt. Eine insgesamt Verbesserung hierbei bedeutet sowohl eine vermehrte Aufnahme, indiziert durch eine Fluoreszenzzunahme, als auch vermehrte Freisetzung nach Aktivierung, wobei letzteres einem sinkenden Fluoreszenzsignal entspricht. Dies konnte exemplarisch bei den Patienten P7 (*JAK2 V617F-HU*) und P3 (*JAK2 V617F+HU*) erreicht werden,

da diese sowohl eine gesteigerte Aufnahme als auch eine gesteigerte Freisetzung nach Aktivierung mit Convulxin (P7) beziehungsweise Thrombin (P7) im Vergleich zur Voruntersuchung zeigten.

Weitere Patienten (P1, P2, P11) hatten zwar eine tendenziell vergleichbare Mepacrine Aufnahme im 1.FU wie im Ersteinschluss, jedoch setzten sie dieses nach Aktivierung aller drei Agonisten-Kombinationen verringert frei.

Umgekehrt war es bei den Patienten P4, P5 und P8, die eine verringerte Mepacrine Aufnahme zeigten, allerdings die Freisetzung erhöht war, sodass verhältnismäßig die Aufnahme und Freisetzung der des Ersteinschlusses entsprach.

Insgesamt zeigten die Patienten im 1.FU eine Annäherungstendenz der Mepacrine Aufnahme und Freisetzung an die Kontrollreferenz mit ASS im Vergleich zum Ersteinschluss.

#### 4.2.2.1.4 Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa Aktivierung

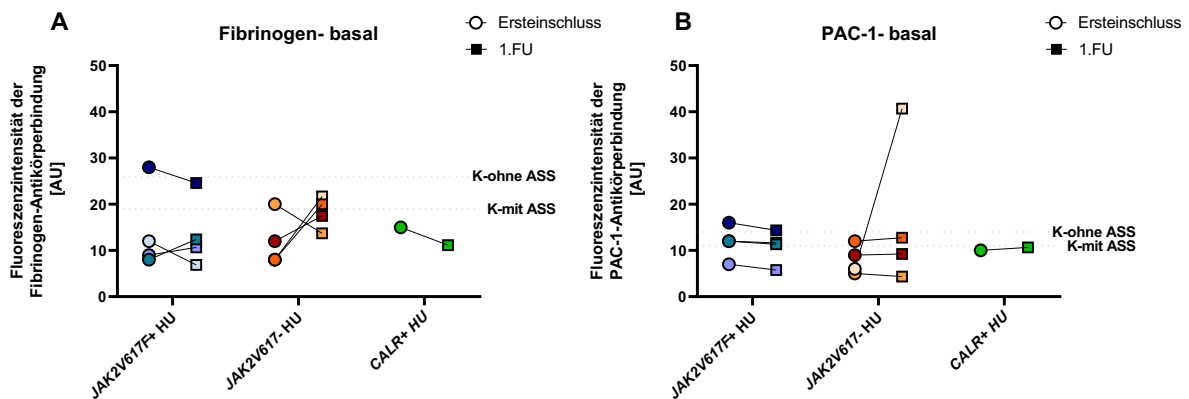


Abbildung 33: basale Bindung von (A) Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Im direkten Vergleich zwischen dem Ersteinschluss und dem 1.FU zeigte sich die basale PAC-1-Bindung in allen Patientengruppen konstant bleibend, mit Ausnahme des Patienten P6, der einen deutlichen Anstieg aufwies. Dieser bestätigte sich in der entsprechenden Fibrinogen-Bindung des Patienten. Insgesamt war die basale Fibrinogen-Bindung dieser Patientengruppe (*JAK2 V617F-HU*) bis auf den Patienten P5 im 1.FU tendenziell steigend im Bereich von Normalwerten, wohingegen bei den

Patienten mit HU Therapie (*JAK2 V617F+HU* und *CALR+HU*) eine konstant bleibende bis leicht-fallenden Entwicklung beobachtet wurde.

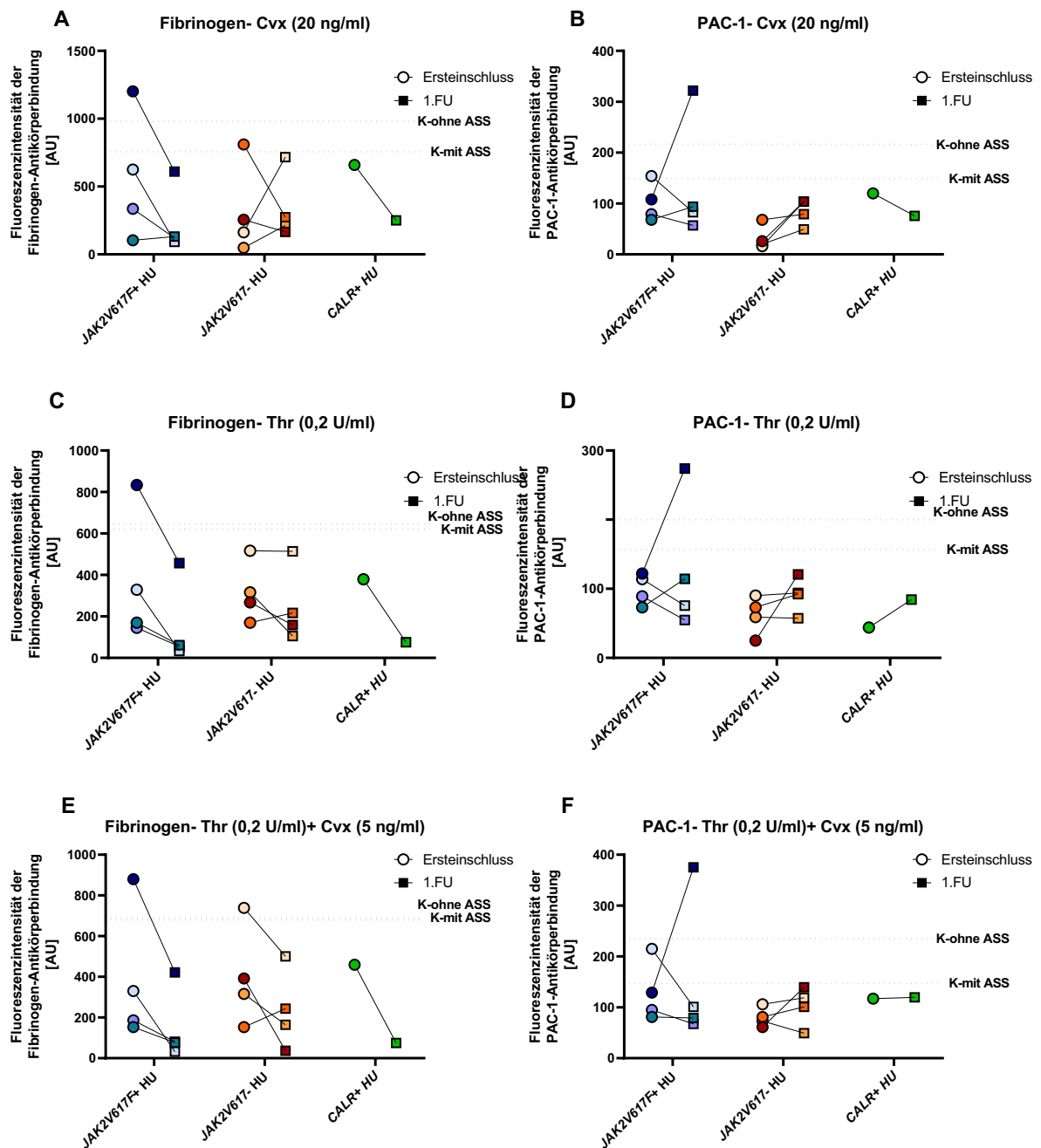


Abbildung 34: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). PAC-1 Bindung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblgende:

ES: P1: P2: P3: P4: P5: P6: P7: P8: P11: P11: P11:  
 1.FU: P1: P2: P3: P4: P5: P6: P7: P8: P11: P11: P11:

Erfolgte eine Stimulation der Thrombozyten, zeigte sich die Fibrinogen Bindung der 1.FU Untersuchung unabhängig des Agonisten und der Patientengruppe tendenziell vermindert. Dabei fiel der Patient P4 (*JAK2 V617F+HU*) durch seinen starken Abfall (circa um 50%) auf, welcher ebenfalls Agonisten unabhängig zu einer Unterschreitung beider Kontrollreferenzen führte. Auch bei den Patienten P7 und P6 (beide *JAK2 V617F-HU*) kam es zu einem Unterschreiten der Kontrollreferenzen im 1.FU, hier allerdings nur nach einer Aktivierung mit Convulxin (P7) beziehungsweise Thrombin+ Convulxin (P6).

Im Gegensatz dazu wiesen die Patienten im 1.FU eine steigende bis konstant bleibende Tendenz der PAC-1 Expression nach thrombozytärer Aktivierung. Diese gegensätzliche Bewegung zwischen Fibrinogen Bindung und PAC-1 Expression wird insbesondere durch den Patienten P4 (*JAK2 V617F+HU*) repräsentiert, da dieser eine starke, Kontrollreferenzen übersteigende Erhöhung der PAC-1 Expression zeigte. Allein der Patient P2 (*JAK2 V617F+HU*) wies auch wie in der Fibrinogen Bindung eine Verminderung der PAC-1 Expression im 1.FU auf, wobei diese nach einer Aktivierung mit Convulxin und in Kombination mit Thrombin (Thrombin+ Convulxin) zu einer Unterschreitung der Referenz K-mit ASS führte.

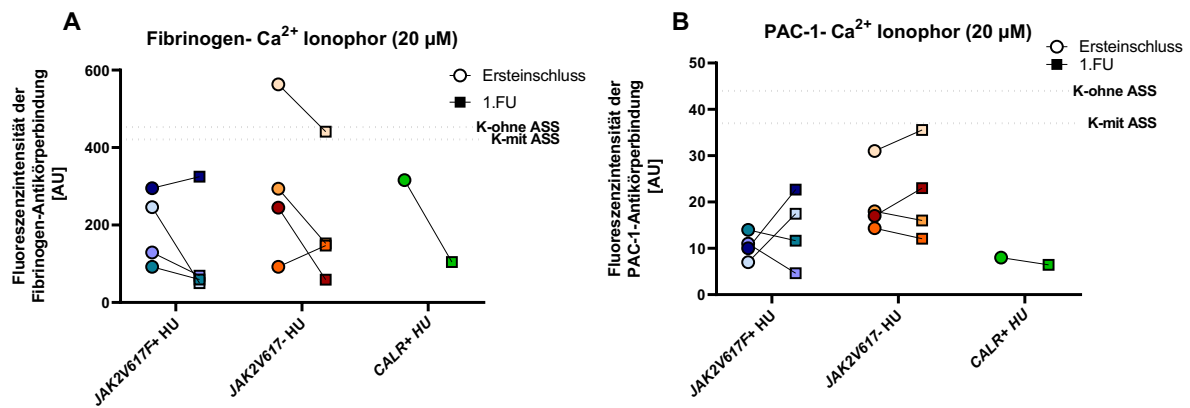


Abbildung 35: Fibrinogen Bindung (A) und PAC-1 Bindung (B) nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F+ HU, JAK2 V617F- HU und CALR+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Nach einer Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) banden die Patienten tendenziell weniger Fibrinogen an den GPIIb/IIIa Rezeptor im 1.FU, wohingegen sie nahezu eine konstant bleibende bis tendenziell steigende PAC-1 Expression aufwiesen. Besonderheiten fielen bei dem Patienten P6 (JAK2 V617F-HU) auf: Dieser lag unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt sowohl mit seiner höheren Fibrinogen-Bindungs-kapazität als auch PAC-1-Bindung deutlich oberhalb der restlichen Patienten. Die Kontrollreferenzen wurden in der PAC-1-Bindung nicht überschritten, allerdings war dies der Fall in der Fibrinogen-Bindung, wobei in der FU-Untersuchung eine deutliche Annäherung an die Kontrollgruppe K-mit ASS erreicht werden konnte.

Resümierend ist der Patient P4 in der Beurteilung des GPIIb/IIIa Rezeptors wie zuvor bezüglich der Granulasekretion durch seine extremen Werte aufgefallen, wobei dieser eine Verminderung der Fibrinogen-Bindung und eine starke Steigerung der PAC-1-Bindung zeigte unabhängig vom eingesetzten Agonisten.

Insgesamt blieben die Fibrinogen-Bindung und die PAC-1 Expression der ET-Patienten unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt mehrheitlich unterhalb der Kontrollreferenzen, wobei die PAC-1 Expression sich vermehrt der Kontrollreferenz K-mit ASS im 1.FU annäherte.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass im Verlauf der Studie eine andere Fibrinogen-Antikörper-Charge eingesetzt wurde, die eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität emittierte und durchschnittlich zu tendenziell verminderten Fluoreszenzsignalen der Thrombozyten führte.

4.2.2.1.5 Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung

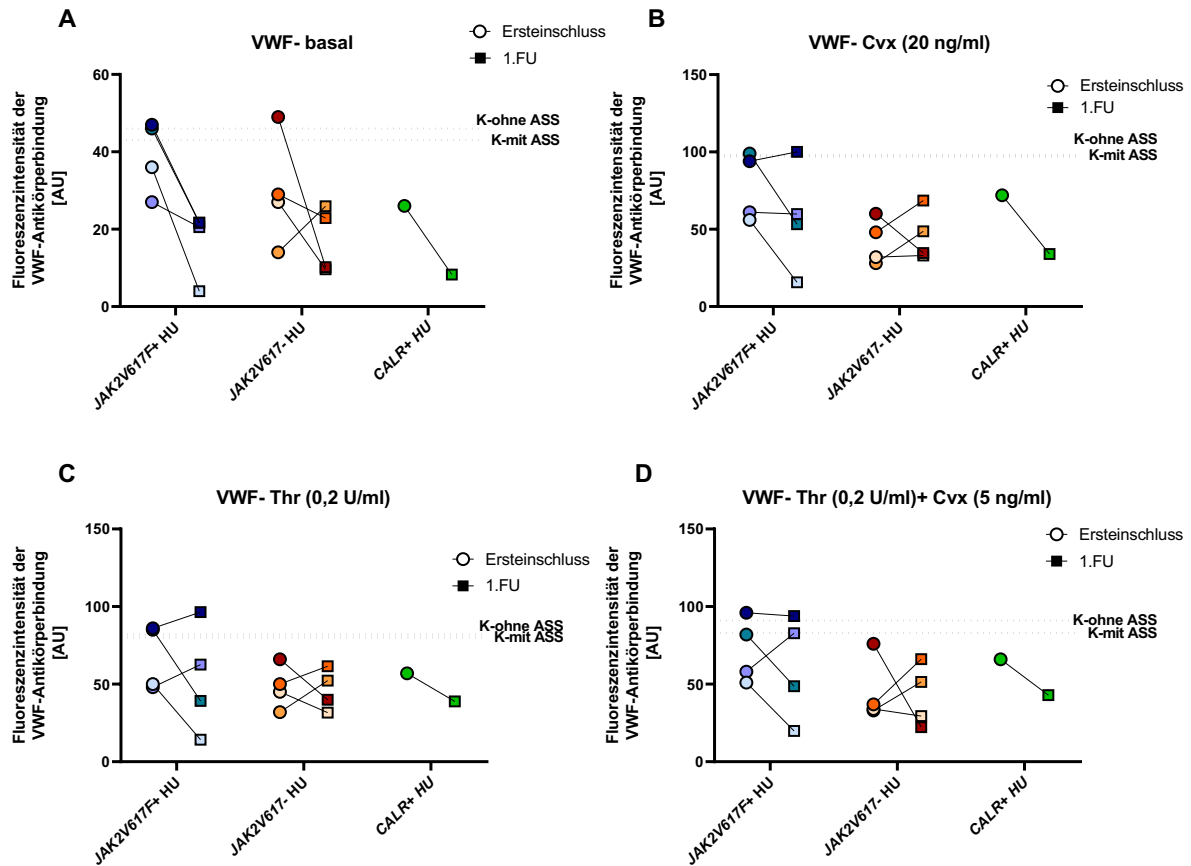


Abbildung 36: VWF Bindung (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ● P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Im nicht *in vitro* aktivierten Zustand der Thrombozyten war die VWF Bindung primär über GPIb $\alpha$  in allen Patientengruppen mehrheitlich tendenziell geringer in der 1.FU-Untersuchung, wodurch es bei drei Patienten (P3, P4, P8) zu einem Unterschreiten beider Kontrollreferenzen kam. Die Ausnahme bildetet der Patient P5 (*JAK2 V617F-HU*), der eine Steigerung zeigte.

Erfolgte eine Aktivierung mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) oder die Kombination davon (Thrombin+ Convulxin) wurde ebenfalls eine verringerte bis konstant bleibende VWF Bindung an die Oberfläche der 1.FU-Thrombozyten unabhängig des Therapie- und Mutationsstatus beobachtet. Hierbei führte allerdings nur noch der Patient P3 zu einer Unterschreitung der Kontrollreferenzen. Im Gegensatz zur basalen Aktivität zeigten neben dem Patienten P5 (*JAK2 V617F-HU*) nun auch die Patienten P7 (*JAK2 V617F-HU*) und P1 (*JAK2 V617F+HU*) eine

gesteigerte Bindung, wobei letzterer dabei nach kombinierter Agonistengabe die Referenz K-mit ASS überschritt. Die VWF Bindung des Patienten P4 (*JAK2* V617F+HU) blieb zwar im 1.FU weitgehend unverändert im Vergleich zur Voruntersuchung, fiel jedoch durch seine insgesamt erhöhten, vergleichbar mit den der K-ohne ASS, Fluoreszenzintensitäten auf.

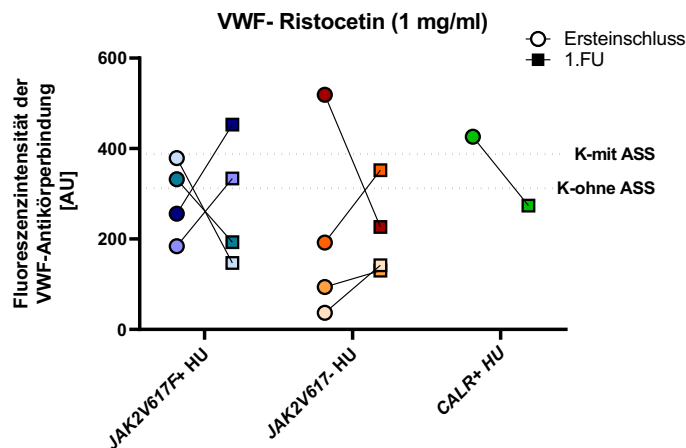


Abbildung 37: VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin (1 mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F+ HU, *JAK2* V617F- HU und *CALR*+ HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblgende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Nach einer Aktivierung mit Ristocetin (1 mg/ml) kam es bei ungefähr der Hälfte (P2, P3, P8, P11) der 1.FU Patienten zu einem Abfall und damit einer verminderten VWF Bindung, die jedoch alle dabei die Referenz K-ohne ASS unterschritten. Bei der anderen Hälfte war eine Steigerung der VWF Bindung zu beobachten, wobei drei dieser Patienten (P1, P4, P7) die Kontrollreferenz K-ohne ASS überschritten.

Insgesamt blieb die VWF Bindung der Mehrheit der Patienten der FU-Untersuchung deutlich unterhalb der Kontrollreferenzen, wobei der Patient P4 ein weiteres Mal durch seine überdurchschnittlich hohen Werte auffiel.

An dieser Stelle soll nochmals daraufhingewiesen werden, dass im Verlauf der Studie eine andere VWF-Antikörper-Charge eingesetzt wurde, die durchschnittlich zu verminderten Fluoreszenzsignalen der Thrombozyten führte.

## 4.2.2.1.6 Vergleich der thrombozytären PDI Oberflächenexpression

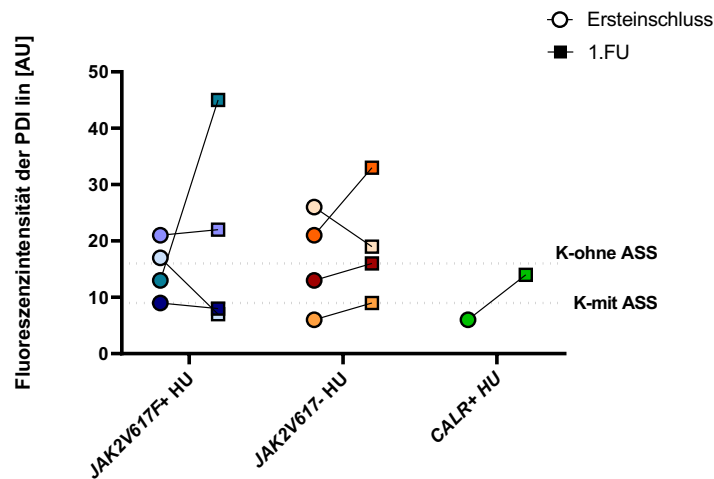


Abbildung 38: PDI Oberflächenexpression auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+* HU, *JAK2 V617F-* HU und *CALR+* HU und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ● P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Im Vergleich zur Erstuntersuchung wiesen die Patienten im 1.FU eine tendenziell vermehrte Expression der PDI auf der Oberfläche der Thrombozyten. Besonders bei dem Patienten P3 (*JAK2 V617F+* HU) war dies auffällig, da die PDI Expression hierbei um beinahe das 5-fache gestiegen ist. Allein bei den Patienten P2 (*JAK2 V617F+* HU) und P6 (*JAK2 V617F-* HU) kam es zu einer verminderten PDI Expression, wodurch das Niveau der Kontrollreferenz mit ASS (P2) und ohne ASS (P6) erreicht wurde.

Insgesamt lag die durchschnittliche PDI Expression der Patienten sowohl in der Erstuntersuchung als auch im 1.FU oberhalb der Kontrollreferenz mit ASS.

## 4.2.2.1.7 Vergleich des thrombozytären mitochondrialen Membranpotenzials (JC1-1)

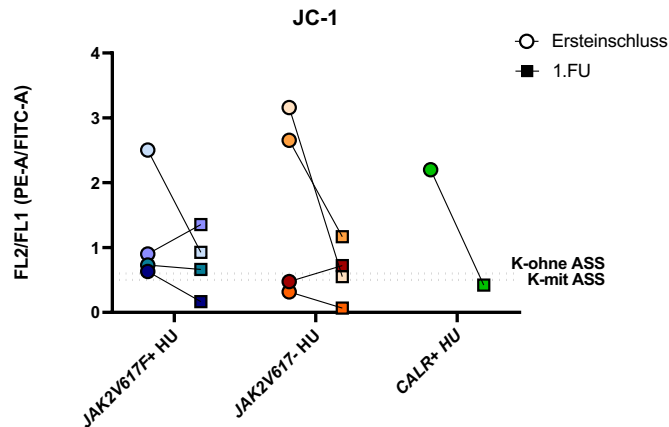


Abbildung 39: Darstellung des MMP der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F+ HU*, *JAK2 V617F- HU* und *CALR+ HU* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS. Farblegende:

ES: P1: ● P2: ○ P3: ● P4: ● P5: ● P6: ● P7: ○ P8: ● P11: ●  
 1.FU: P1: ■ P2: ■ P3: ■ P4: ■ P5: ■ P6: ■ P7: ■ P8: ■ P11: ■

Das MMP der Patienten im 1.FU zeigte mehrheitlich einen Abfall im Vergleich zum Ersteinschluss, wodurch sich das MMP an das der Kontrollreferenzen annäherte. Bei zwei Patienten (P4, P7) wurde in diesem Zuge die Kontrollreferenz mit ASS sogar unterschritten, was auf eine Hypopolarisation der inneren Mitochondrienmembran hinweist. Die restlichen Patienten wiesen ein tendenziell konstant bleibendes MMP im Bereich der Kontrollen auf, bis auf P1, der eine leicht steigende Tendenz zeigte.

## 4.2.2.2 Intra-individueller Vergleich der Thrombozytenfunktion bei 1.FU ET Patienten mit klinischen und therapeutischen Veränderungen

Vier der 13 1.FU ET Patienten erhielten im Laufe des 1.FU einen Therapiewechsel, wobei zwei Patienten (P9, P10) von HU auf Anagrelid und ein Patient (P12) von HU auf Interferon- $\alpha$  umgestellt worden sind. Bei dem Patienten P13 wurde HU komplett abgesetzt. Darüber hinaus wurden bei zwei dieser Patienten (P9, P13) eine Post-ET-MF diagnostiziert.

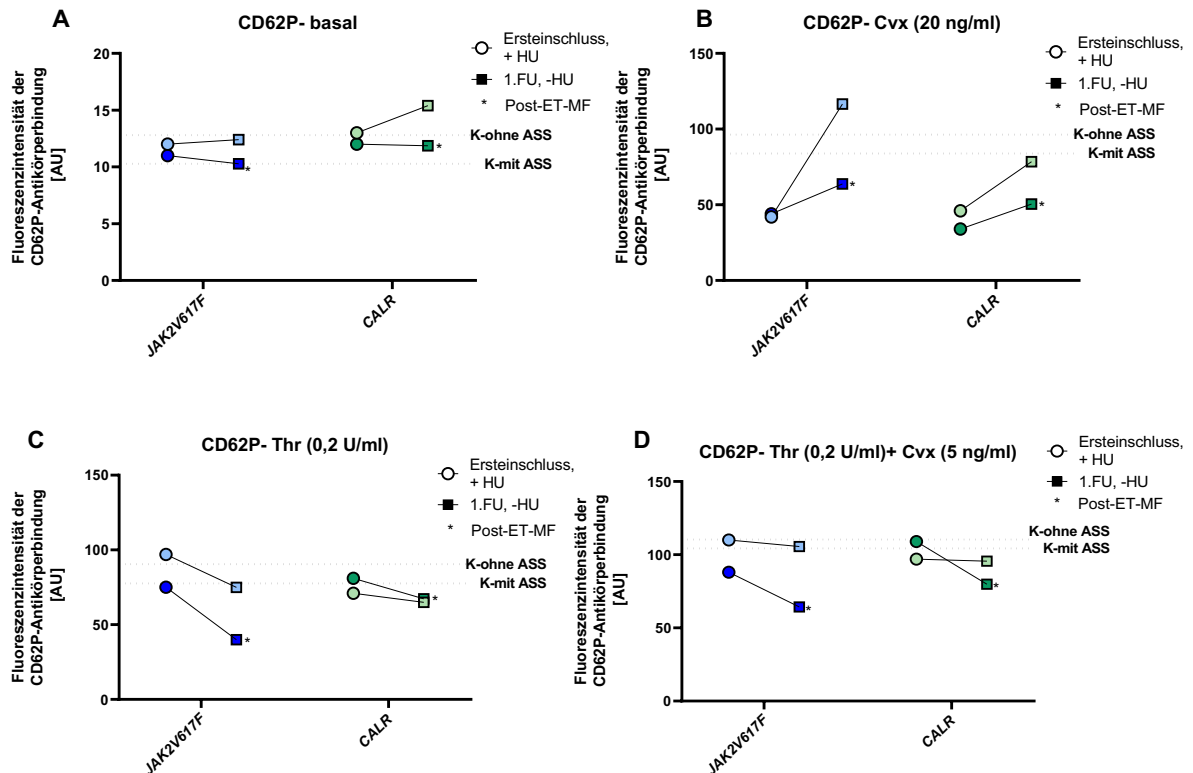
4.2.2.2.1 Vergleich der thrombozytären  $\alpha$ -Granula-Freisetzung

Abbildung 40: CD62P Expression (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, \*: Post-ET-PMF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ● P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: □ P12: ■ P13\*: ■

Bei Betrachtung der basalen CD62P Expression der ET-Patienten, bei denen es innerhalb des 1.FU zu einem Therapiewechsel kam, wurden keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zum Ersteinschluss beobachtet. Die Präsentation von P-Selektin im nicht aktivierten Zustand der Thrombozyten verhielt sich hierbei vergleichbar mit der der Kontrollreferenzen.

Im Gegensatz dazu zeigten die 1.FU Patienten ohne Krankheitsprogression (P10, P12) einen deutlichen Anstieg der CD62P Expression im Vergleich zum Ersteinschluss nach einer Aktivierung über den GPVI-Rezeptor, wodurch es bei dem Patienten P10 zum Überschreiten der Kontrollreferenzen kam. Die 1.FU Patienten mit einer Post-ET-MF (P9, P13) hingegen exprimierten dabei nur leicht vermehrt bis tendenziell konstant bleibend CD62P.

Sowohl nach einer Aktivierung mit Thrombin alleine als auch in Kombination mit Convulxin ist die CD62P Expression bei den Patienten ohne Krankheitsprogress (P10, P12) tendenziell konstant geblieben im 1.FU und bei den Patienten mit Post-ET-MF (P9, P13) leicht sinkend gewesen, wodurch die letzteren unterhalb des Niveaus der K-mit ASS fielen.

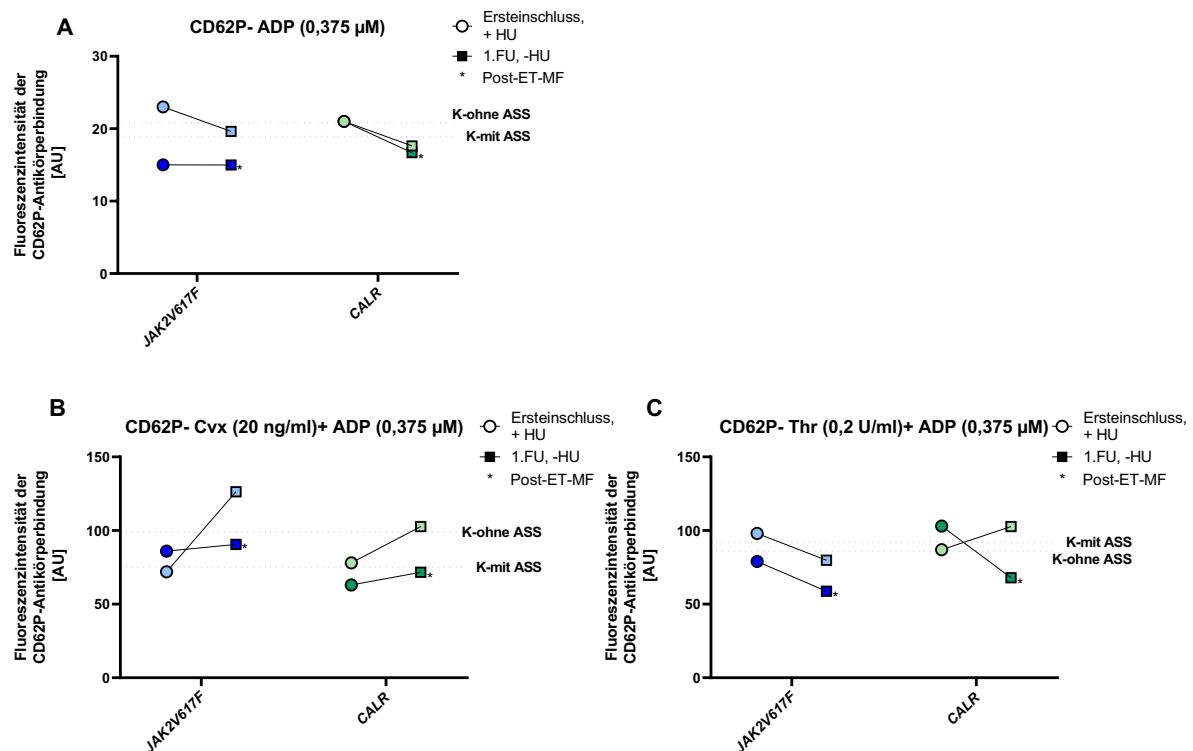


Abbildung 41: CD62P Expression nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, ADP: Adenosindiphosphat, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Erfolgte eine thrombozytäre Aktivierung isoliert mit ADP (0,375 µM), so blieb die CD62P Expression aller 1.FU Patienten mit Therapiewechsel nahezu unverändert bis tendenziell leicht-fallend im Vergleich zum Ersteinschluss. Die Kombination von ADP (0,375 µM) und Convulxin (20 ng/ml) hingegen zeigte bei den Patienten des 1.FU mit alleinigem Therapiewechsel eine deutliche Steigerung der CD62P Expression, sodass das Niveau der K-ohne ASS überschritten wurde. Bei den 1.FU Patienten, bei denen eine Post-ET-MF (P9, P13) diagnostiziert wurde, war diese konstant geblieben. Bei Stimulation der Thrombozyten mit ADP (0,375 µM) und Thrombin (0,2 U/ml) kam es dagegen zu einem deutlichen Abfall der CD62P Expression dieser Patienten (P9, P13), was zu einem Unterschreiten der Kontrollreferenzen führte.

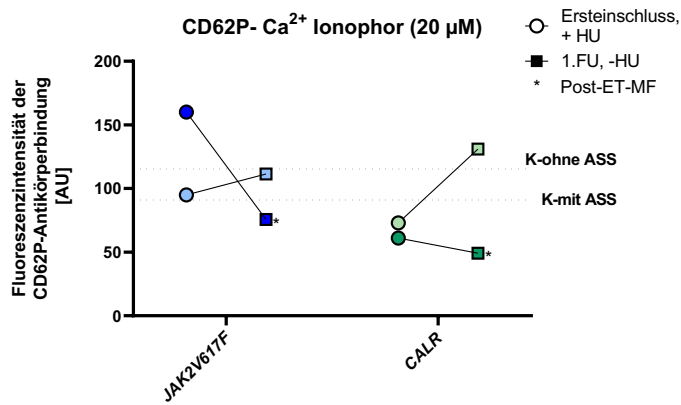


Abbildung 42: CD62P Expression nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor ( $20 \mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: □ P12: □ P13\*: ■

Die Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor führte bei dem 1.FU Patienten mit Krankheitsprogression und einem Therapiewechsel auf Anagrelid (P9) zu einem starken Abfall der CD62P Expression mit Unterschreiten der K-mit ASS, wohingegen es bei dem Patienten mit einem Therapiewechsel auf Interferon-alpha P(12) zu einem starken Anstieg mit Überschreitung der K-ohne ASS dieser kam. Die anderen beiden Patienten zeigten im 1.FU eine tendenziell konstant bleibenden CD62P Expression.

Resümierend wiesen die Patienten mit einer Post-ET-MF (P9, P13) durchgehend eine insgesamt niedrigere CD62P Expression im Vergleich zu den Patienten mit alleinigem Therapiewechsel (P10, P12) sowie beider Kontrollgruppen auf.

#### 4.2.2.2.2 Vergleich der thrombozytären lysosomalen- und $\delta$ -Granula-Freisetzung (CD 63, LAMP-1)

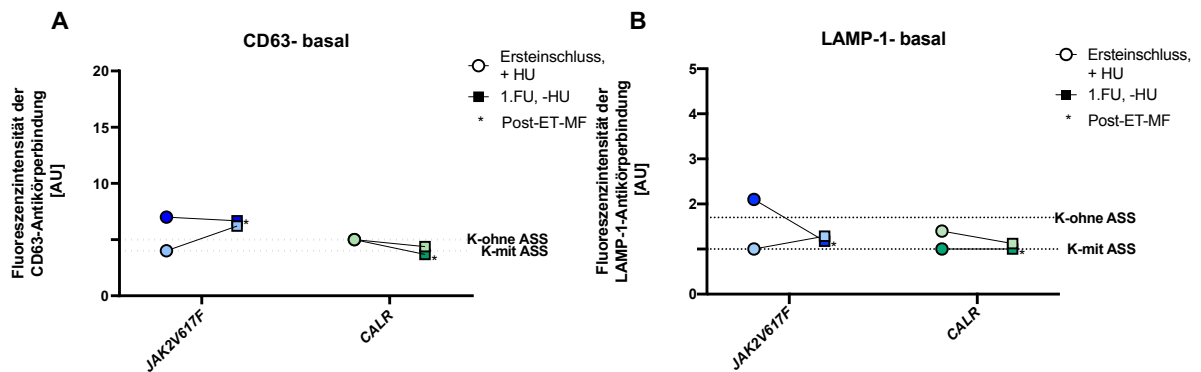


Abbildung 43: basale Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblgende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Die Expression von CD63 und LAMP-1 blieb bei den 1.FU Patienten mit einem Therapiewechsel der Patientengruppe *CALR*-HU im basalen Zustand nahezu unverändert im Vergleich zum Ersteinschluss. Im Gegensatz dazu zeigte der Patient P9 mit einer Post-ET-Entwicklung eine Verringerung der basalen LAMP-1 Präsentation, wohingegen es bei dem Patienten P10 zu einer Zunahme dieser und der CD63 Expression kam.

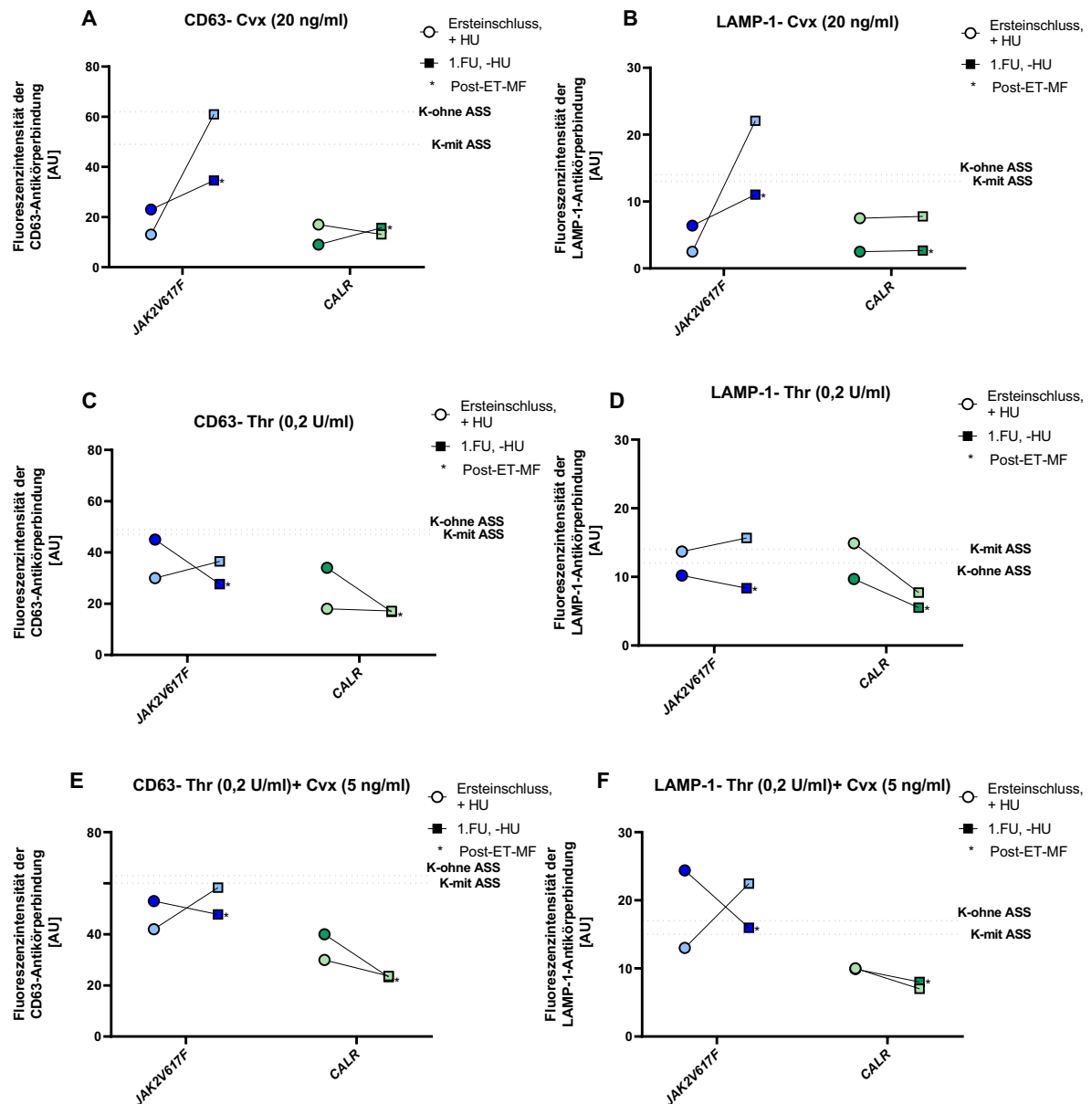


Abbildung 44: CD63 Expression nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). LAMP-1 Expression nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, \*: Post-ET-MF. Farblgende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ● P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Nach einer thrombozytären Aktivierung mittels Convulxin (20 ng/ml) kam es bei den Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation zu einem Anstieg der CD63 und LAMP-1 Expression während des 1.FU, wobei dies bei dem Patienten P10 zu einem deutlichen

Überschreiten der Kontrollreferenzen führte. Die Patienten mit einer *CALR* Mutation zeigten weiterhin keine Veränderungen im Vergleich zum Ersteinschluss.

Wurden die Thrombozyten mit Thrombin (0,2 U/ml) beziehungsweise in Kombination von Thrombin und Convulxin (0,2 U/ml + 5 ng/ml) stimuliert, ergab sich ein vergleichbares Bild: Bei den Patienten, die im Laufe des 1.FU eine Post-ET-MF entwickelt hatten, sank tendenziell die Expression von sowohl CD63 als auch LAMP-1. Auch die des Patienten P12 verringerte sich im 1.FU, wohingegen die des Patienten P10 eine steigende Tendenz zeigte.

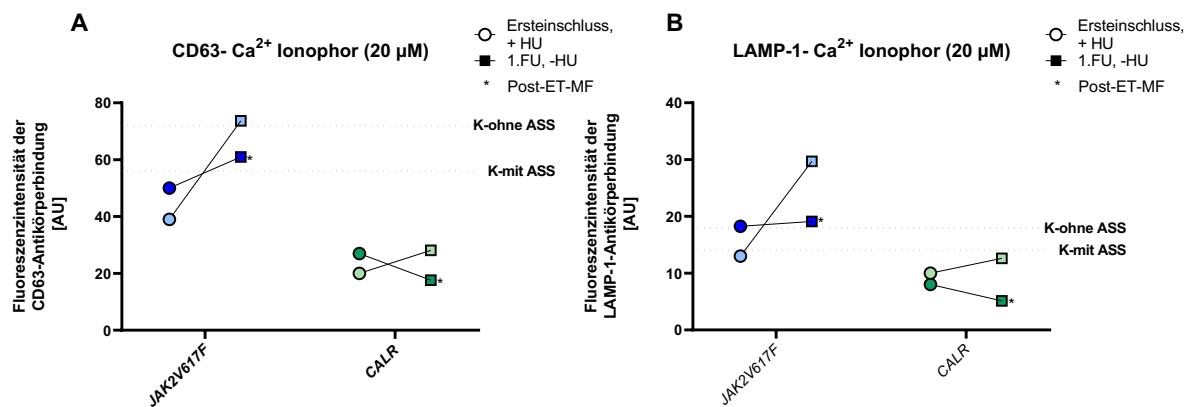


Abbildung 45: Expression von (A) CD63 und (B) LAMP-1 nach Aktivierung mit Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Die Tendenzen der CD63 und LAMP-1 Expression nach Stimulation über Ca<sup>2+</sup> Ionophor (20 µM) zeigten sich in etwa vergleichbar wie die nach einer thrombozytären Aktivierung des GPVI Rezeptors (über Convulxin) mit einer Zunahme der Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation und nahezu konstant bleibender Expression der Patienten mit einer *CALR* Mutation.

Wie auch zuvor bei der Freisetzung der α-Granula fiel auf, dass die Patienten mit einer Post-ET-MF mehrheitlich ein geringeres Niveau der lysosomalen und δ-granulären Freisetzung im Vergleich zu dem jeweiligen Patienten aus der Mutationsgruppe ohne Krankheitsprogress aufwiesen. Darüber hinaus machte sich ein Unterschied zwischen den Mutationsgruppen bemerkbar, indem die Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation im 1.FU durchweg ein höheres Expressionsniveau hatten als die aus der *CALR* Gruppe.

4.2.2.2.3 Vergleich der thrombozytären Mepacrine Aufnahme und Freisetzung

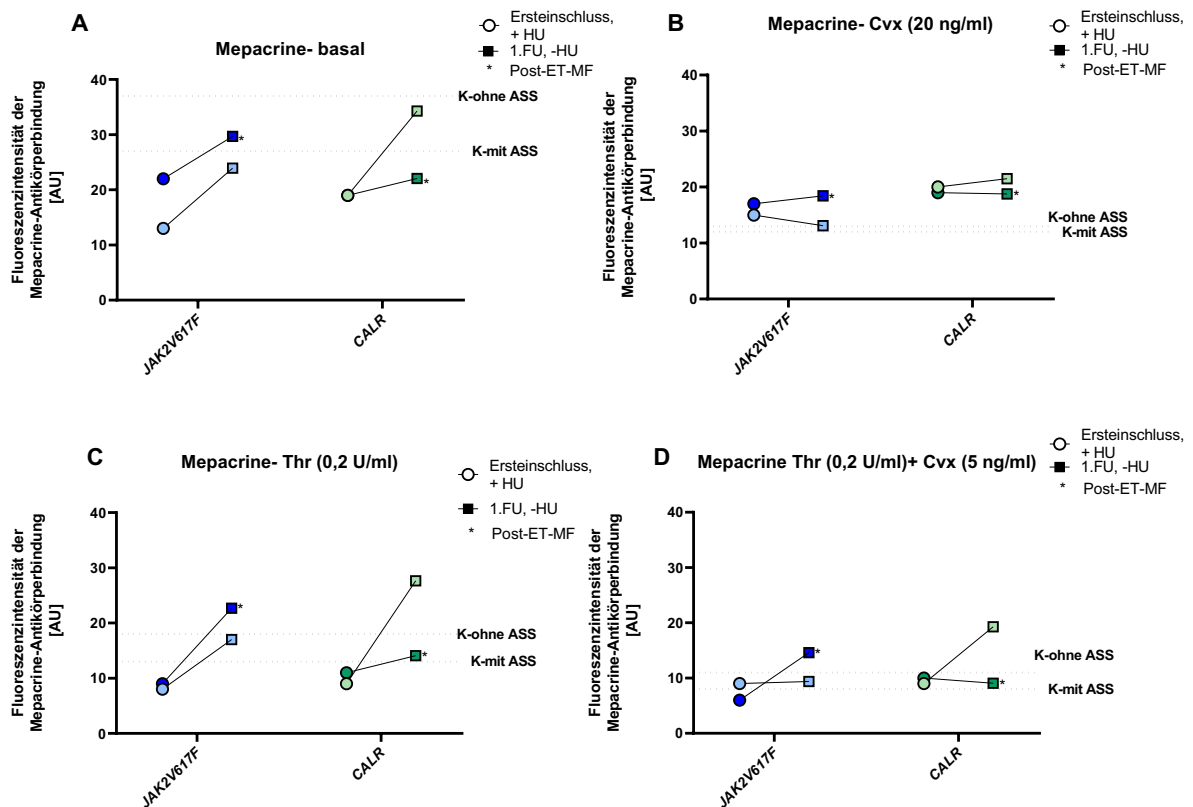


Abbildung 46: Mepacrine (A) Aufnahme (basal) und Freisetzung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml) sowie (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ● P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: □ P12: ■ P13\*: ■

Die Auswertung des Mepacrine Assays ergab, dass die Mepacrine Aufnahme bei allen vier Patienten tendenziell gestiegen ist und sich somit im Laufe des 1.FU der  $\delta$ -SPD bei P12 und P10 fast normalisiert hat.

Der Patient mit einer *JAK2 V617F* Mutation (P9) und Post-ET-MF zeigte zwar eine tendenziell erhöhte Aufnahme im 1.FU, die Freisetzung war jedoch insbesondere nach einer Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) vermindert. Im Gegensatz dazu verblieb die Mepacrine Aufnahme und Freisetzung bei dem Patienten mit einer *CALR* Mutation und Post-ET-PMF (P13) im 1.FU auf einem konstant niedrigen Niveau.

Die beiden anderen Patienten mit einem Therapiewechsel waren in ihrer Mepacrine Aufnahme und Freisetzung vergleichbar mit dem Patienten P9.

## 4.2.2.2.4 Vergleich der thrombozytären GPIIb/IIIa Aktivierung

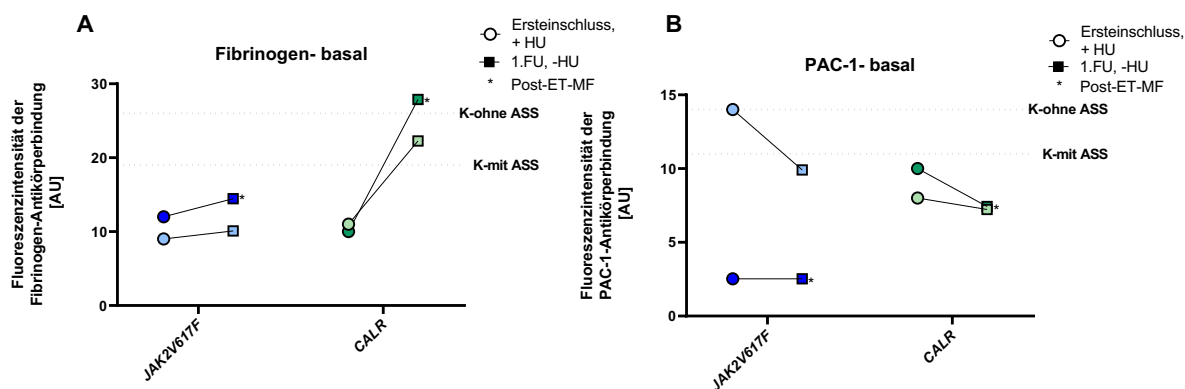


Abbildung 47: basale Bindung von (A) Fibrinogen und (B) PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Die Patienten der Mutationsgruppe *JAK2* V617F mit durchgemachtem Therapiewechsel (P9, P10) zeigten im 1.FU eine gleichbleibende Fibrinogen-Bindung im basalen Zustand der Thrombozyten, wohingegen bei den Patienten mit einer *CALR* Mutation (P12, P13) im 1.FU eine starke, Kontrollreferenzen überschreitende Zunahme der Fibrinogen-Bindungskapazität beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu war die entsprechende PAC-1-Bindung dieser Patientengruppe tendenziell geringer in der FU-Untersuchung ebenso die des Patienten P10 aus der *JAK2* V617F Mutationsgruppe, die dabei Kontrollreferenz unterschreitend war. Die PAC-1-Bindung des Patienten P9 blieb im 1.FU konstant niedrig.

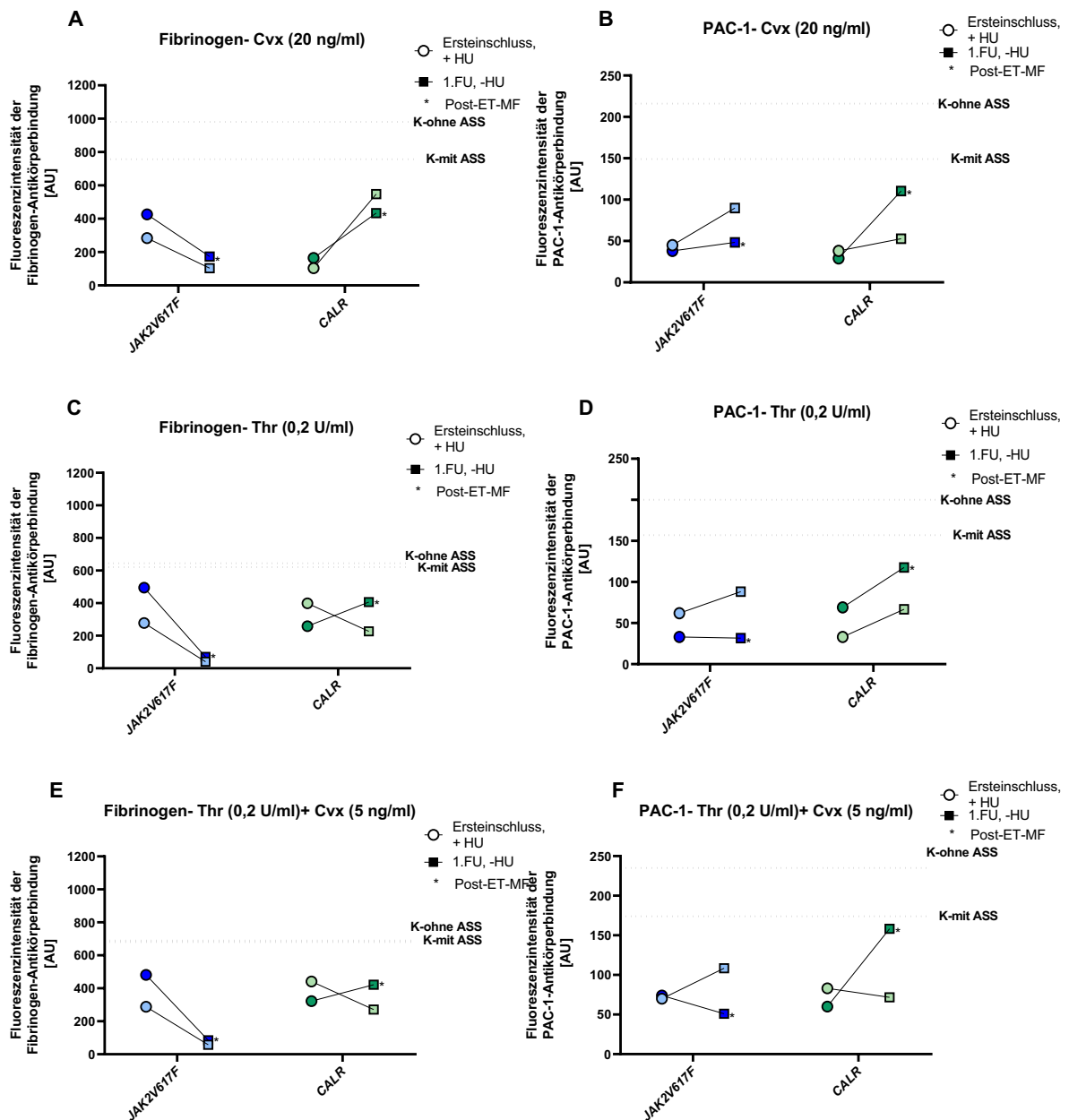


Abbildung 48: Fibrinogen Bindung nach Aktivierung mit (A) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (E) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). PAC-1 Bindung nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml), (F) Thrombin (0,2 U/ml) + Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, \*, Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: □ P12: □ P13\*: ■

Nach Stimulation der Thrombozyten (mit Convulxin (20 ng/ml), Thrombin (0,2 U/ml) und Thrombin+ Convulxin (0,2 U/ml+ 5 ng/ml)) fand in den Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation (P9, P10) eine geringere Fibrinogen-Bindung im 1.FU statt. Die korrespondierende PAC-1-Bindung zeigte bei dem Patienten P9 keine Veränderung

im Vergleich zur Voruntersuchung, wohingegen sie bei dem Patienten P10 im 1.FU tendenziell steigend war.

Im Gegensatz dazu zeigte sich sowohl die Fibrinogen-Bindung als auch die PAC-1-Bindung bei dem Patienten P13 aus der anderen Mutationsgruppe (*CALR*) durchgehend steigend in der 1.FU Untersuchung. Bei dem zweiten Patienten dergleichen Mutationsgruppe (P12) war dies auch der Fall, bis auf nach Aktivierung mit Thrombin (0,2 U/ml) und der Kombination aus Thrombin+ Convulxin (0,2 U/ml+ 5 ng/ml).

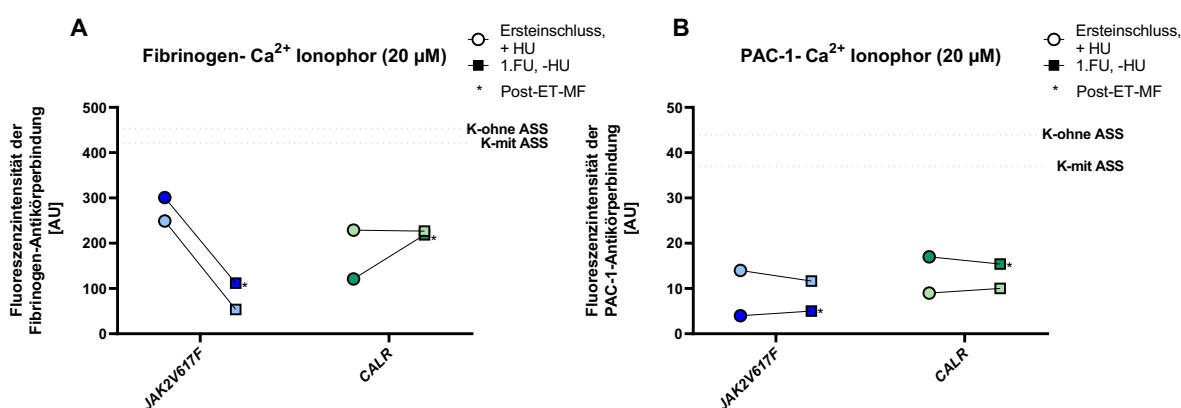


Abbildung 49: : Fibrinogen Bindung (A) und PAC-1 Bindung (B) nach Aktivierung mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor ( $20 \mu\text{M}$ ) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2* V617F und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Die thrombozytäre Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionophor ( $20 \mu\text{M}$ ) führte bei den Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation ebenfalls zu einer verminderten Fibrinogen-Bindung im 1.FU, wohingegen bei dem Patient P13 der anderen Mutationsgruppe eine entgegengesetzte Tendenz zu sehen war. Der Patient P12 zeigte eine konstant bleibende Fibrinogen-Bindung im Vergleich zur Voruntersuchung, was sich in der PAC-1-Bindung widerspiegelte. Insgesamt blieb die PAC-1-Bindung hierbei bei allen Patienten mit erfolgtem Therapiewechsel nahezu konstant.

In der Gesamtschau der Ergebnisse der Fibrinogen-Bindung und PAC-1-Bindung ist hervorzuheben, dass diese durchgehend unterhalb des Niveaus der Kontrollreferenzen lag. Auffällig war außerdem, dass die Fluoreszenzintensitäten des Patienten P9 kontinuierlich niedriger und die des Patienten P13 tendenziell höher als die der anderen Patienten waren.

4.2.2.2.5 Vergleich der thrombozytären VWF-Bindung

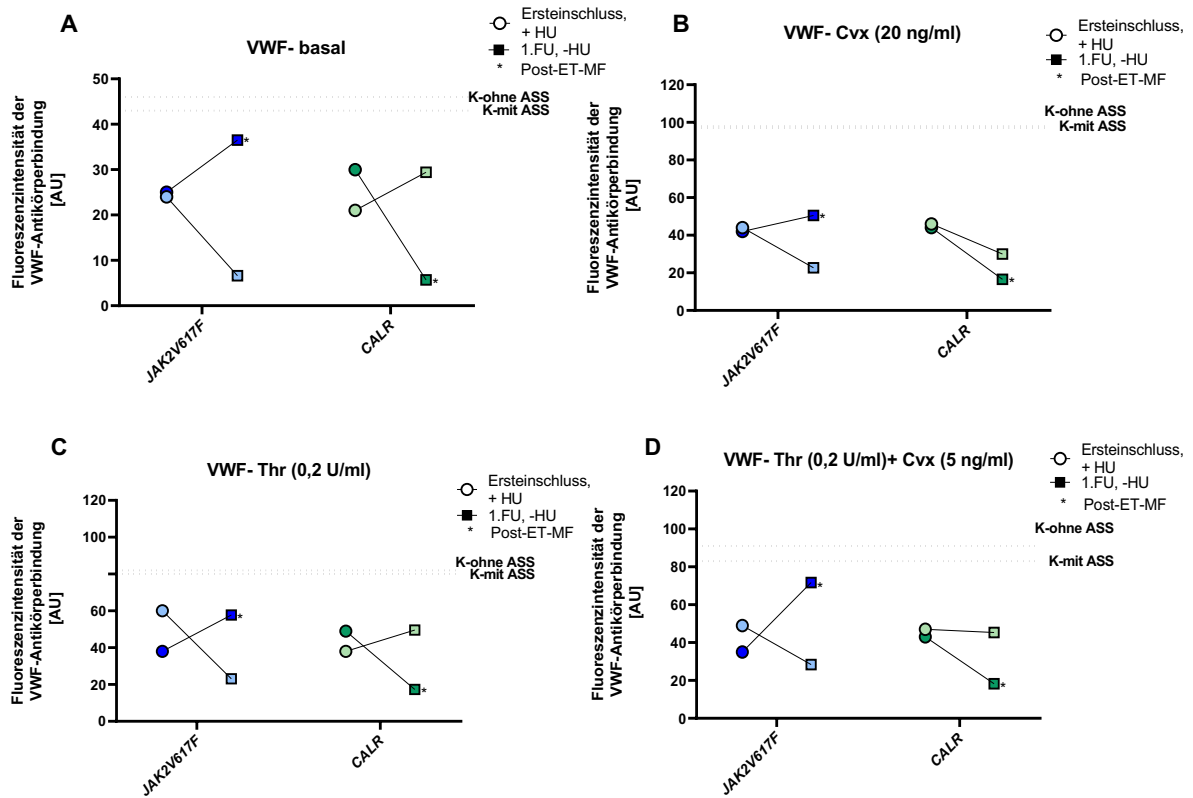


Abbildung 50: VWF Bindung (A) im basalen Zustand und nach Aktivierung mit (B) Convulxin (20 ng/ml), (C) Thrombin (0,2 U/ml), (D) Thrombin (0,2 U/ml)+ Convulxin (5 ng/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit JAK2 V617F und CALR Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, Cvx: Convulxin, Thr: Thrombin, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: □ P12: □ P13\*: ■

Bei isolierter Betrachtung der 1.FU ET Patienten, die im Laufe des 1.FU einen Therapiewechsel erhielten, war bei dem Patienten P9 eine durchgehend erhöhte Tendenz der VWF Bindung unabhängig des Aktivierungsstatus zu beobachten, wobei das Niveau der Kontrollreferenzen nicht erreicht wurde. Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Patienten eine entgegengesetzte (P10, P13) bzw. konstant bleibende (P12) Tendenz.

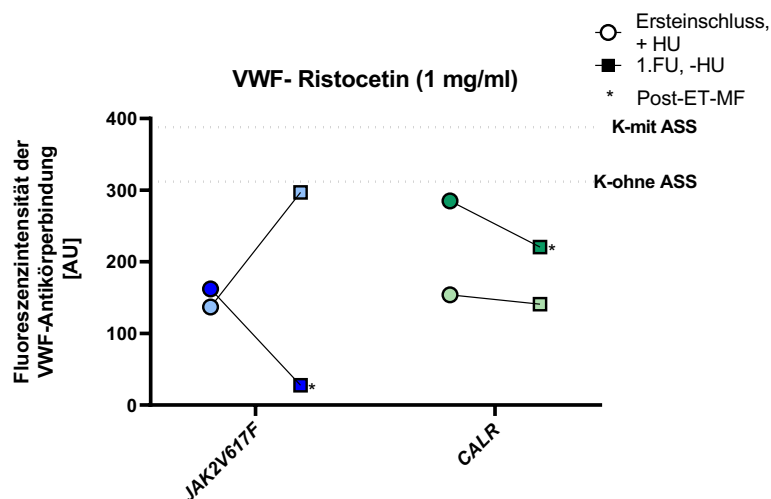


Abbildung 51: VWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin (1 mg/ml) auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ○ P12: ○ P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Nach einer Stimulation der Thrombozyten mit Ristocetin (1 mg/ml) wies nun der Patient P10 eine erhöhte VWF Bindung im 1.FU auf, wodurch das Niveau der K-ohne ASS angenähert wurde. Der Patient P9 hingegen zeigte die entgegengesetzte Tendenz. Die anderen beiden Patienten (P12, P13) zeigten die gleiche Entwicklung im 1.FU wie nach Aktivierung mit Thrombin+ Convulxin (0,2 U/ml+ 5 ng/ml).

Insgesamt lagen die 1.FU Patienten auch hier unterhalb des Niveaus der Kontrollreferenzen.

#### 4.2.2.2.6 Vergleich der PDI Oberflächenexpression auf Thrombozyten

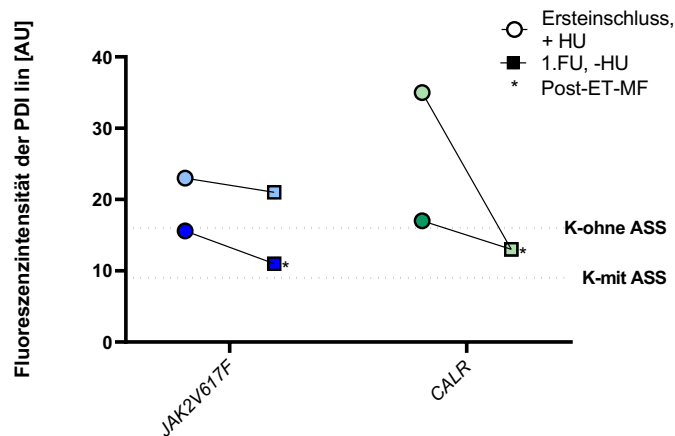


Abbildung 52: PDI Oberflächenexpression auf der Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* Mutationen und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS; \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ● P12: ● P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

In der Patientengruppe der Therapiewechsler zeigte die Mehrheit (P9, P10, P13) eine tendenziell konstant bleibende bis fallende PDI Oberflächenexpression in der 1.FU-Untersuchung, wohingegen bei dem Patient P12 ein starker Abfall zu beobachten war und dadurch das Niveau der K-ohne ASS erreichte wurde.

#### 4.2.2.2.7 Vergleich des thrombozytären MMP (JC-1)

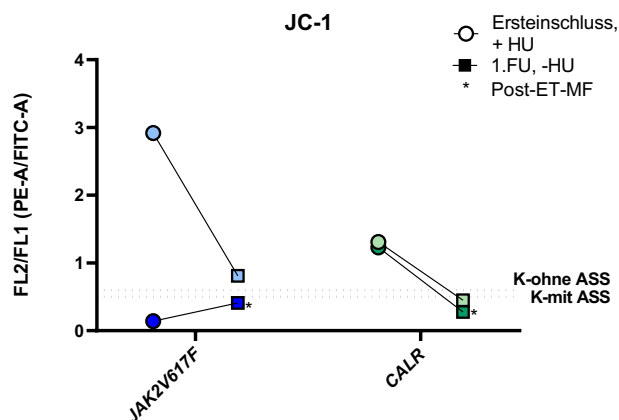


Abbildung 53: Darstellung des MMP der Thrombozyten von ET-Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR* und von Kontrollprobanden mit bzw. ohne ASS (angegeben ist der Mittelwert). Abkürzungen: K-ohne ASS: Kontrollen ohne ASS, K-mit ASS: Kontrollen mit ASS, \*: Post-ET-MF. Farblegende:

ES: P9\*: ● P10: ● P12: ● P13\*: ●  
 1.FU: P9\*: ■ P10: ■ P12: ■ P13\*: ■

Hingegen wiesen drei der Patienten des Therapiewechsels im 1.FU bezüglich des MMP eine sinkende Tendenz auf, bei diesen eine Annäherung an das Referenzniveau der K-mit ASS erreicht wurde. Der Patient P9 zeigte eine leichte Erhöhung des MMP, sodass sich das MMP ebenfalls der K-mit ASS annäherte.

## 5 Diskussion

Nach einer mittleren Follow-up Zeit von 14,5 Monaten (1.FU) wurden weder neu aufgetretene Thrombose- noch Blutungsereignisse in unserer Follow-up Kohorte mit 13 Patienten beobachtet. Zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses wurden bei sieben Patienten ein erworbenes VWS erfasst, was sich im Laufe des 1.FU nur noch bei einem Patienten laborchemisch nachweisen lies (P5). Keiner der 1.FU Patienten starb, jedoch entwickelten zwei der Patienten eine Krankheitsprogression in Form von einer Post-ET-MF (P9, P13). Außerdem traten bei zwei der Patienten (P10, P12) keratotische Veränderungen unter HU Therapie auf, weshalb diese auf eine Alternativ-Therapie mit Anagrelid bzw. Interferon- $\alpha$  umgestellt wurden. Ohne Betrachtung der vier Patienten, die einen Therapiewechsel bzw. eine Krankheitsprogression zeigten, erhielten vier Patienten (*JAK2* V617F Mutation) und ein Patient (*CALR*-Mutation, Typ 2) sowohl im Ersteinschluss als auch im 1.FU eine Zytoreduktion mit HU. Darüber hinaus nahmen während der gesamten Studiendauer elf Patienten ASS unabhängig vom Mutationsstatus und zytoreduktive Therapie ein. Die Tendenz der Thrombozyten-Konzentration im Laufe des 1.FU war bei den Patienten mit einer zytoreduktiven Therapie mit HU (*JAK2* V617F+HU, *CALR*+HU) mehrheitlich fallend und erreichte dabei eine Annäherung an das Niveau der Kontrollreferenzen. Dagegen die Patienten ohne eine Zytoreduktion wiesen eine steigende Thrombozyten-Konzentration auf. Der Wechsel der Zytoreduktion von HU auf ein Zweitlinien Medikament hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Thrombozyten-Konzentration, sie blieb nahezu konstant. Bei den Patienten, die im Laufe des 1.FU eine Post-ET-MF entwickelten, wurde ein starker Abfall der Thrombozyten-Konzentration beobachtet.

### 5.1 Vergleich der Thrombozytenfunktion gesunder Kontrollprobanden mit und ohne ASS Einnahme

Die basale Expression zeigte sich bei der Mehrzahl der Funktionsparameter (CD62P, Fibrinogen-Bindung, PAC-1, statistisch auffällig) bei den Kontrollen mit ASS geringer als im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Nach erfolgter Agonisten-Aktivierung (weitesgehend unabhängig der Agonisten) blieb diese Tendenz bestehen, die thrombozytäre Expression/Bindung der Aktivitätsparameter war bei den Kontrollen mit ASS mehrheitlich geringer. Dieses Ergebnis wäre somit so zu interpretieren, dass bei der  $\alpha$ -Granula-Sekretion sowie der GPIIb/IIIa Integriaktivierung die thrombozytäre Aktivierung über den TxA<sub>2</sub>-Signalweg eine Rolle spielt. Da auch nach Stimulation über

Ca<sup>2+</sup>-Ionophor, Unterschiede zwischen den Kontrollen ohne ASS und den Kontrollen mit ASS zu sehen waren (K-ohne ASS zeigte mehrheitlich eine höhere Aktivierung als K-ASS), ist die TxA<sub>2</sub>-Sensitivität eher nicht auf Rezeptor-abhängige intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungseffekte zurückzuführen, sondern wahrscheinlich auf nachgeschaltete TxA<sub>2</sub>-Synthese/Freisetzungseffekte. Es ist bereits bekannt, dass durch ASS die TxA<sub>2</sub> vermittelte Aktivierung der Thrombozyten gehemmt wird und daher in einer verminderten thrombozytären Aktivierung resultiert [115]. Diese thrombozytäre TxA<sub>2</sub>-Sensitivität zeigte Vallés et al neben der GPIIb/IIIa Aktivierung auch in der P-Selektin Expression, was sich mit unseren Ergebnissen deckt [116].

Die antithrombozytäre Wirkung von ASS beruht bekanntermaßen auf einer kovalenten Acetylierung der Hydroxyl-Gruppe der COX-1 [117], wodurch beispielsweise die verminderte Thrombozyten-Aggregation und P-Selektin Expression erklärt werden kann [118]. Darüber hinaus sind weitere Effekte von ASS auf den thrombozytären Metabolismus beschrieben. Ornelas et al. benennen diese in Form von einer durch ASS induzierten Acetylierung von Proteinen des Citratzyklus und der Elektronentransportkette der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung [118]. Diese Effekte von ASS auf den mitochondrialen Metabolismus sind ebenfalls in unseren Ergebnissen zu sehen. Die Thrombozyten der Kontrollen mit ASS wiesen ein tendenziell höheres MMP mit einer statistischen Auffälligkeit im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS auf. Daraus wäre zu vermuten, dass durch diese Acetylierung ein erhöhtes MMP auftritt und damit eine verstärkte Thrombozyten-Aktivität. Um dies weiter aufzuschlüsseln bzw. zu bestätigen bedarf es jedoch weiterführende Untersuchungen.

## 5.2 Abnormalitäten der Thrombozyten-Funktion von ET Patienten bei der 1. FU

In dieser Arbeit wurde eine Reihe an funktionalen Parametern der Thrombozyten durchflusszytometrisch untersucht, womit eine Aussage über den Aktivierungszustand *in vivo* und der Aktivierbarkeit *in vitro* der 1.FU ET-Thrombozyten ermöglicht wurde. Bereits in der Vergangenheit wurde mehrfach beschrieben, dass es bei Patienten mit ET zu Störungen der Thrombozyten-Funktion kommen kann [33]. Dabei ist es von wesentlicher Bedeutung zwischen einer thrombozytären Hyper- und Hypofunktion zu differenzieren, um so mögliche klinische Assoziationen wie eine thromboembolische,

hyperfunktionale Tendenz bzw. Blutungsdiathese mit thrombozytärer Hypofunktion zu identifizieren.

### 5.2.1 Hypofunktion der Thrombozyten bei Patienten mit ET

#### 5.2.1.1 $\delta$ -„Storage Pool Deficiency“ ( $\delta$ -SPD), GPVI-Defekt und lysosomale Störung bei Patienten mit ET

Charakteristisch für einen  $\delta$ -SPD ist eine Störung der dichten  $\delta$ -Granula der Thrombozyten, was sich klinisch in einer milden bis moderaten Blutungsneigung äußern kann und beispielsweise in hereditären Thrombozyten-Störungen wie z. B. das Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) auftritt [119, 120].

Bedeutend dabei ist, zwischen einem Defizit der  $\delta$ -Granula (Quantität), welches durch eine verminderte Anzahl der  $\delta$ -Granula sowie deren Inhalt (ADP/ATP, Serotonin) gekennzeichnet ist und einer gestörten Freisetzung des Granulainhaltes (Qualität) zu unterscheiden [121]. Eine qualitative Störung ist entweder auf einen Defekt der Thrombozyten-Aktivierung bzw. Signaltransduktion bei vorhandener Granula oder auf Fehlen von bestimmten Inhaltsstoffen zurückzuführen [122]. Da es für die Beurteilung einer qualitativen Störung weiterführende Untersuchungen wie beispielsweise einer Serotonin-Freisetzungsanalyse mittels ELISA oder massenspektrometrischer Bestimmung bedarf, konnte diese im Rahmen dieser Arbeit nicht näher evaluiert werden.

Selle et. al [123-125] berichteten in Fallbeispielen von einer verminderten Sekretion an ADP bzw. verminderten Anzahl an  $\delta$ -Granula Thrombozyten von Patienten mit einer MPN, was auf einen  $\delta$ -SPD hindeutet. Im Gegensatz zu der hereditären  $\delta$ -SPD wie z.B. beim HPS, wird das Auftreten der Störung im Rahmen von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wie der ET als erworbenes  $\delta$ -SPD bezeichnet [126].

In unserer Auswertung zeigte sich ein  $\delta$ -SPD insofern, dass die Expression von CD63 auf der Thrombozyten-Oberfläche der ET Patienten im 1.FU nach Aktivierung unabhängig vom eingesetzten Agonisten inklusive  $Ca^{2+}$ -Ionophor deutlich vermindert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen war. Da zudem alle angewandten Agonisten eine abnormale CD63 Expression induzierten, spricht dies für einen quantitativen Defekt des  $\delta$ -SPD unserer 1.FU ET Kohorte. Insbesondere stark ausgeprägt war diese Verminderung bei den Thrombozyten der Patienten mit einer *CALR* Mutation. Eine

solche Verminderung der thrombozytären CD63 Expression in ET findet sich ebenso in der Arbeit von Jensen et al. und in anderen Publikationen [126, 127].

Auffällig war jedoch, dass die basale CD63 Expression der Patienten mit einem *JAK2* V617F Mutationsstatus im Vergleich zu den gesunden Probanden leicht erhöht war. Bei genauer Betrachtung der thrombozytären Tendenz im Vergleich zum Ersteinschluss zeigt sich außerdem, dass die CD63 Expression tendenziell gestiegen ist im 1.FU. Eine tendenzielle Hyperfunktion der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation konnte in einer früheren Studie von Coucelo et al. bestätigt werden, deren Ergebnisse eine erhöhte CD63 Expression ebenfalls im nicht aktivierten Zustand und nach Aktivierung (durch die Agonisten Thrombin und Arachnoidonsäure) bei Patienten mit *JAK2* V617F Mutation zeigten [128].

Zur näheren Analyse der quantitativen Präsenz bzw. qualitativen Ausstattung der  $\delta$ -Granula wurde der Mepacrine-Assay durchgeführt, da Mepacrine als fluoreszierendes Acridin Derivat spezifisch in die  $\delta$ -Granula über ADP (und ATP) bindet und in diesen akkumuliert [125, 129]. Auch hier zeigte sich eine Störung der  $\delta$ -Granula in Form von einer verminderten Mepacrine Aufnahme bei der Mehrzahl der ET Patienten sowohl zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses als auch in der 1.FU Untersuchung (nahezu konstant bleiben), unabhängig des Mutationsstauts. Nur bei zwei Patienten (P3, P7) war eine tendenziell zu den Kontrollen mit ASS vergleichbare thrombozytäre Mepacrine-Aufnahme zu sehen. Beide wiesen eine *JAK2* V617F Mutation auf, jedoch erhielt nur einer von ihnen eine Therapie mit HU (P3).

Gemeinsam mit der insgesamt reduzierten CD63 Expression deutet dies umso mehr auf eine quantitative Störung der  $\delta$ -Granula ( $\delta$ -SPD) der Thrombozyten mit ET hin. Auffällig war außerdem, dass wie bezüglich der CD63 Expression nach einer Stimulation über den Kollagen Rezeptor GPVI eine verminderte Freisetzung von Mepacrine erfolgte, was zusätzlich zu einem  $\delta$ -SPD einen GPVI Rezeptor Defekt implizieren könnte. Eine solche Hyporeaktion in Antwort auf Kollagen wurde zwar bislang in der ET noch nicht beschrieben, jedoch im Rahmen anderer MPN wie der CML [126] sowie im MDS [130]. Unsere Ergebnisse liefern einen möglichen Ansatz, dass auch in der ET ein erworbener GPVI Defekt auftreten kann wie z.B. in Form von einer verminderten Oberflächenexpression des GPVI-Rezeptors, was im Rahmen einer anderen Dissertation mit dem selbigen Patientenkollektiv in der Arbeitsgruppe von Dr. Jurk untersucht wurde.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Thrombozyten der ET Patienten im 1.FU zwar auch eine verminderte CD63 Expression nach Aktivierung über GPVI zeigten, jedoch bei direktem Vergleich zur selbigen im Ersteinschluss eine deutliche verbessernde Tendenz aufwiesen. Man könnte die Vermutung stellen, ob ein solcher GPVI Defekt in ET möglicherweise reversibel ist. Klinisch würde dafürsprechen, dass im Laufe des 1.FU keine weiteren Blutungsereignisse aufgetreten sind. Ob eine Zytoreduktion ebenfalls einen Einfluss hat, lässt sich nicht eindeutig sagen, da eine Besserung der thrombozytären CD63 Expression unabhängig der Therapie aufgetreten ist. Weiterführende Arbeiten wären daher notwendig, um diese Fragestellung beantworten zu können.

Die Frage nach einer möglichen Pathogenese dieser erworbenen  $\delta$ -Granula Störung (und gleichzeitig eines möglichen GPVI Defekts) beantwortete Selle et al. damit, dass es zu einer defekten Reifung des Thrombozyten aus dem Megakaryozten kommen könnte und damit einhergehend zu einer verminderten Produktion der  $\delta$ -Granula [126]. In der Tat scheint dieser Ansatz plausibel, da auch bei anderen myeloproliferativen Erkrankungen wie zum Beispiel der akuten Leukämien es durch die unkontrollierte Proliferation zu einer Produktion unreifer Zellen kommt. Dass unreife Thrombozyten ebenso bei der ET auftreten, bestätigten mehrere aktuelle Studien [29, 131]. Analoge Untersuchungen zur Quantifizierung unreifer Thrombozyten im Blut desselben Patientenkollektivs wurden im Rahmen einer anderen Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jurk durchgeführt. In wieweit diese unreifen Thrombozyten den  $\delta$ -SPD aufweisen, wäre ein interessanter Aspekt für zukünftige Untersuchungen.

Analog zum  $\delta$ -SPD und GPVI Defektes könnte eine reduzierte thrombozytäre CD62P Expression, wie sie in unseren Ergebnissen bei den 1.FU ET Patienten mit einer *CALR* Mutation zu beobachten war, auf einen  $\alpha$ -Granula Defekt hindeuten. Nach Agonistengabe von ADP stieg allerdings die CD62P Expression der Thrombozyten der *CALR* Mutation Patienten, sodass der  $\alpha$ -Granula Defekt kompensiert wurde. Folglich ist dieser eher als Ausdruck des fehlenden bzw. verminderten ADP aus der  $\delta$ -Granula ( $\delta$ -SPD) anzusehen und nicht als zusätzlichen  $\alpha$ -Granula Defekt.

Auffällig war außerdem, dass es zu Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von Mepacrine und CD63 bei Stimulation über Thrombin und der Kombination aus Convulxin plus Thrombin kam: Hierbei verhielt sich die Mepacrine Freisetzung weitgehend unauffällig, wohingegen die CD63 Expression vermindert war. Dies könnte

einerseits einen Hinweis auf einen moderaten  $\delta$ -SPD geben, da über den Agonisten Thrombin (und in Kombination mit Convulxin) eine Ausschüttung von ADP/ATP möglich war, sodass keine komplette Defizienz der  $\delta$ -Granula vorzuliegen scheint.

Andererseits könnte diese Diskrepanz auf ein Defizit der thrombozytären Lysosomen hindeuten, da das auch als Lysosomal Integral Membrane Protein 1 (LIMP-1) bekannte CD63 an Lysosomen-assoziierte Organellen bindet, zu welchen die dense Granula und auch Lysosomen zählen, sodass CD63 Aussagen für beide Granula-Typen erlaubt [67, 121].

Mithilfe des Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) Assays, welches als spezifischer Marker für Lysosomen angesehen wird [67], konnten wir dies weiter erörtern. Unsere Ergebnisse ergaben, dass auch die LAMP-1 Expression nach einer Stimulation über die Thrombin-Rezeptoren PAR-1 und PAR-4 zusammen mit ihrem Korezeptor GPIIb $\alpha$  statistisch auffällig geringer gegenüber den Kontrollprobanden war [132]. Diese Tendenz zeigte sich nahezu konstant bleibend im Vergleich zum Ersteinschluss.

Dies untermauert die Hypothese, dass ebenfalls eine Störung der lysosomalen Freisetzung in der ET vorliegen kann. Die Ursache hierfür könnte analog wie beim  $\delta$ -SPD an einer gestörten Produktion der Lysosomen oder einer pathologisch veränderten lysosomalen Signaltransduktion angesichts der unkontrollierten Proliferation liegen. Da nach meinem besten Wissen die lysosomale Freisetzung im Verlauf der ET in meinen Analysen zum ersten Mal untersucht wurde, wären weitere Studien notwendig, um eine solche Störung mit Gewissheit zu bestätigen.

Als Fazit ist zu sagen, dass die Ergebnisse sowohl der CD63 Expression als auch der Mepacrine-Aufnahme starke Hinweise auf einen  $\delta$ -SPD der Thrombozyten der 1.FU Patienten, insbesondere der Patienten mit einer *CALR* Mutation unabhängig von der HU-Medikation, geben. Des Weiteren gilt es, einen möglichen thrombozytären GPVI Defekt in ET sowie eine thrombozytäre lysosomale Störung weiter zu evaluieren.

#### 5.2.1.2 Störung der thrombozytären GPIIb/IIIa-Aktivierung bei Patienten mit ET

Wie der  $\delta$ -SPD ist auch eine Störung der thrombozytären GPIIb/IIIa-Aktivierung ein bekanntes Phänomen in der ET. Cortelazzo et. al postulierte, dass diese erworbene Störung ähnliche Eigenschaften aufweisen würde, wie sie auch bei dem hereditären

GPIIb/IIIa Rezeptor Defekts, der Glanzmann Thrombasthenie, zu finden sei [133]. Klinisch kann dies wie der  $\delta$ -SPD über eine verlängerte Blutungszeit bzw. Blutungstendenz auffällig werden.

Ein Defekt in der thrombozytären GPIIb/IIIa-Aktivierung war auch in meinen Ergebnissen zu sehen. Vor allem die Fibrinogen-Bindungskapazität an den GPIIb/IIIa Rezeptor als dessen indirekter Marker zeigte sich bei den ET Patienten mit statistischer Auffälligkeit stark reduziert im Vergleich zu den Kontrollgruppen (und auch im direkten Vergleich zum Ersteinschluss), am stärksten bei den Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation unabhängig von der HU-Therapie. Weniger extrem, aber dennoch statistisch auffällig war eine verminderte Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors, dargestellt über die Bindung des PAC-1-Antikörpers als direkter Marker für aktivierte GPIIb/IIIa, der ET Patienten zu beobachten. Die PAC-1 Expression der Thrombozyten des 1.FU zeigte sich mit einer vergleichbaren Tendenz zu den Ergebnissen des Ersteinschlusses.

Moore et al. diskutierten in ihrer Arbeit als mögliche Ursache dieser Störung eine fehlerhafte Signaltransduktion des PI3 kinase/Rap1/Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) Signalweges [35]. Der PI3 kinase/Akt Signalweg ist von großer Bedeutung für die Aktivierung der PKC, welche wiederum eine Aktivierung des GPIIb/IIIa ermöglicht. Ist dies gestört, so ist auch keine Fibrinogen-Bindung mehr möglich und damit die Thrombozyten-Aggregation stark beeinträchtigt. Darüber hinaus postulieren Coucelo et. al, dass man die Störung des Signalweges auf eine Herunterregulation des PI3 kinase/Rap1 Signalweges zurückführen kann, induziert durch eine *JAK2 V617F* Mutation [128], die eine autonome Aktivität der Herunterregulation mehrere Signalwege (darunter PI2K/Akt) bewirkt. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen insofern, dass die ET Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation die niedrigste Fibrinogen-Bindung nach Aktivierung zeigte.

Eine weitere denkbare Pathogenese der Thrombozyten-Aggregationsstörung bei Patienten mit ET wäre eine quantitative Verminderung des GPIIb/IIIa Rezeptors, was im Kontext einer weiteren Dissertation mit demselben Patientenkollektiv in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jurk untersucht wurde.

Anzumerken ist, dass es im Laufe der Studie zu einem Chargenwechsel des Fibrinogens kam und dabei tendenziell verminderte Fibrinogen-Fluoreszenzsignale beobachtet worden sind. Jedoch betraf der Wechsel sowohl die Kontrollkohorte als

auch die 1.FU ET Patienten, sodass davon ausgegangen werden könnte, dass die Relation zwischen der thrombozytären Fibrinogen Signale der Kontrollprobanden und der 1.FU ET Patienten weiterhin durch die Ergebnisse repräsentativ angesehen werden können. Die allerdings teilweise stark fallende Tendenz der Fibrinogen-Bindung der Thrombozyten des 1.FU im Vergleich zum Ersteinschluss könnte mit dem Chargenwechsel (und damit einer möglichen überschätzten Hypotendenz im 1.FU) in Zusammenhang gebracht werden. Als weiterer Vergleichsparameter für die Aktivität des GPIIb/IIIa Rezeptors gilt wie bereits erwähnt die thrombozytäre PAC-1 Expression, welche im Laufe des 1.FU eine konstante Tendenz aufwies. Da diese keinen Chargenwechsel erfuhr, wäre somit die thrombozytäre PAC-1 Expression zur Beschreibung der Tendenz im 1.FU im Vergleich zum ES in Bezug auf die GPIIb/IIIa Aktivität möglicherweise als repräsentativer anzusehen.

Zusammenfassend wurden anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ein globaler Aktivierungsdefekt von GPIIb/IIIa der Thrombozyten von den 1.FU ET Patienten unabhängig des Mutationsstatus und der zytoreduktiven Therapie sowie der eingesetzten Agonisten herausgearbeitet.

#### 5.2.1.3 Verminderte thrombozytäre Bindung des VWF bei Patienten mit ET

Im Rahmen dieser Studie untersuchte ich ebenfalls sowohl die primär über GPIIb $\alpha$  vermittelte Bindung des autologen VWF *ex vivo* als auch nach Thrombozyten-Aktivierung *in vivo*. Diese war bei den 1.FU ET Patienten weitgehend unabhängig des Mutationsstatus und der zytoreduktiven Therapie im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit einer statistischen Auffälligkeit vermindert. Zudem zeigte der direkte Vergleich zum Ersteinschluss eine z.T. sehr starke Verminderung der VWF Bindung im 1.FU.

Vergleichbar mit dem Wechsel der Fibrinogen-Chargen wurden auch die anti-VWF-AK im Laufe des 1.FU gewechselt, was analog eine Erklärung für die tendenziell stark erniedrigten Fluoreszenzsignale im Vergleich zum Ersteinschluss sein könnte. Um eine definitive Aussage über die Tendenz der VWF Bindung im Verlauf der ET stellen zu können, bedarf es daher einer erneuten Untersuchung mit anti-VWF-AK aus einer Charge. Da die Kontrollprobanden ebenfalls von dem Chargenwechsel (teilweise) betroffen waren, könnte die tendenzielle thrombozytäre Hypoaktivität der VWF Bindung der ET-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden dennoch als repräsentativ angesehen werden.

Andere mögliche Ursachen dieser verminderten VWF Bindung der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten waren in der Vergangenheit bereits Gegenstand kontroverser Diskussionen. Eine populäre Ansicht ist, dass hierbei eine erhöhte Thrombozyten-Konzentration eine entscheidende Rolle bei der Funktion des VWF spielt. Dabei wird davon ausgegangen, dass es durch eine extreme Thrombozytose ( $>1000 \times 10^9/L$ ) zu einer begünstigten Proteolyse des VWF kommen soll und damit ein erworbenes VWS hervorgerufen wird [134, 135]. Die laborchemischen Parameter mit einer verlängerten Blutungszeit, verminderter VWF Aktivität/ VWF Antigen Ratio ( $< 0,7$ ) und einem Mangel an VWF Multimere zeigen dabei Ähnlichkeiten mit einer hereditären Von Willebrand Erkrankung (VWS Typ II) [136].

Repräsentativ dazu zeigt sich in unserer ET-Kohorte die Patientin P5, die zur Patientengruppe mit einer *JAK2 V617F* Mutation gehört. Hier wurde ein erworbenes VWS sowohl klinisch (initial erhöhte Blutungsneigung, MZS in Form von Migräne) als auch laboranalytisch diagnostiziert. Letzteres äußerte sich durch eine verminderte VWF Aktivität/ VWF Antigen Ratio (0,59) bei gleichzeitiger extremer Thrombozytose (bei Ersteinschluss:  $1282 \times 10^9/L$ ). Dies bekräftigt die Hypothese, dass ein erworbenes VWS in Assoziation mit extrem hohen Thrombozyten-Konzentrationen auftreten kann [137]. In der folgenden 1.FU-Untersuchung waren jedoch keine weiteren Blutungs- oder Thromboseereignisse aufgetreten und auch die Thrombozytenkonzentration zeigte eine fallende Tendenz ( $1038 \times 10^9/L$ ), das erworbene VWS blieb jedoch weiterhin bestehen. Aufgrund des insgesamt günstigen Risikoprofils sowie des jungen Alters der Patientin (32 Jahre) entschied man sich bis dato gegen eine zytoreduktive Therapie mit HU und vorerst nach dem „watch and wait“-Prinzip zu verfahren. Bezüglich der MZS erfolgte unter kritischer Rücksicht des vorliegenden erworbenen VWS eine symptomatische Therapie mit ASS, worunter die Patientin beschwerdefrei war.

In der Thrombozyten-Funktionsanalyse fiel auf, dass die Thrombozyten dieser Patientin sowohl basal als auch nach Agonistenaktivierung fast einheitlich eine verminderte Funktion aufwiesen. Damit entsprechen diese Ergebnisse dem klinischen Bild mit der (initialen) Blutungstendenz der Patientin.

Eine Ausnahme bildete dabei der VWF-Assay. Dabei zeigten die Thrombozyten zwar weiterhin eine erniedrigte Thrombozyten-Funktion im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden (K-ASS und K-ohne ASS), jedoch eine deutliche Steigerung innerhalb des 1.FU. Dies könnte eine Besserung der thrombozytären VWF Interaktion

implizieren. Unterstützt wird dies einerseits durch eine leichte Reduktion der Thrombozyten-Konzentration (von  $1282 \times 10^9/L$  auf  $1038 \times 10^9/L$ ) und andererseits durch fehlende weitere aufgetretene Blutungsereignissen im 1.FU. Van Genderen et. al berichtete bereits, dass eine Reduktion der erhöhten Thrombozyten-Konzentration eine Besserung des erworbenen VWS bewirkt [32].

Von einem anderen Gesichtspunkt betrachtete Lancellotti et al. die Frage, wie die Veränderungen des VWF bei ET Patienten mit kontrollierten Thrombozyten-Zahlen, z.B. mittels Zytoreduktion aussehen könnten. Ihre Ergebnisse zeigten, dass es ebenfalls zu Modifizierungen des VWF kommen kann, was sich in einer verminderten VWF Aktivität und VWF Multimere, jedoch einer Erhöhung der VWF Antigene präsentieren würde. Letzteres erklärten sie durch eine abnormale Produktion des Antigens durch unreife Megakaryozyten und Thrombozyten in Folge der monoklonalen Proliferation. Die Reduktion der VWF Multimere dagegen beriefen sie auf eine atypische Proteolyse durch die Metalloproteasen ADAM-10 und ADAM-17. Eine erhöhte Aktivität der allgemein weitläufigeren bekannten ADAMTS-13, wie sie überwiegend bei Autoimmunerkrankungen wie die erworbene TTP und ITP zu finden ist, wurde in der Kohorte von Lancellotti et al.'s Arbeit nicht nachgewiesen [138].

Diese Erkenntnisse könnten ein Erklärungsansatz für die gestörte thrombozytäre VWF Bindung für diejenigen ET Patienten unserer Studie (z.B. P2) sein, die eine normale Thrombozyten-Konzentration hatten und deren VWF Störungen und einhergehenden Blutungssymptomatik nicht vollständig durch eine extreme Thrombozytose und erworbenem VWS zu erklären waren.

In der Arbeit von Mazzucato et al. wurde zudem beobachtet, dass es in der ET zu einer verminderten Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptor auf den Thrombozyten kommen kann [34]. Diese Quantifizierung wurde ebenfalls in einer anderen Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jurk untersucht und wird daher hier nicht näher diskutiert.

Resümierend zeigen die Ergebnisse zusätzlich einen globalen Defekt der Bindungskapazität des VWF an die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten unabhängig der Mutation, zytoreduktiven Therapie sowie der eingesetzten Agonisten.

5.2.1.4 Exemplarische Patienten der ET Kohorte mit hypoaktiven Thrombozyten-Profil  
Insgesamt dienen als Beispiel für eine hypofunktionale Thrombozytenaktivität mit einem klinischen Korrelat einer Blutungsneigung die Patienten P1 und P2 unserer ET

Kohorte. Beide gehören der Patientengruppe *JAK2 V617F+* HU an und zeigten im Laufe des 1.FU eine moderate Thrombozytenreduktion von  $452 \times 10^9/L$  auf  $318 \times 10^9/L$  (P2) bzw. eine Steigerung der Thrombozytenkonzentration von  $467 \times 10^9/L$  auf  $710 \times 10^9/L$  (P1). Klinisch ließ sich die Blutungstendenz bei beiden Patienten in einer erhöhten Hämatomneigung eruieren. Zudem gab der Patient P1 ein anamnestisches erworbenes VWS an.

In der Thrombozytenfunktionsanalyse zeigte sich insbesondere bei den Thrombozyten des Patienten P2 eine durchgehende reduzierte Thrombozytenaktivität sowohl basal als auch nach Agonisten-Stimulation im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden sowie z.T. im Vergleich zu den anderen ET Patienten, mit einer hypoaktiven Tendenz im Laufe des 1.FU. Dies war vor allem in der verminderten GPIIb/IIIa und VWF-Bindung sowie  $\delta$ -Granula Sekretion zu sehen.

Ebenfalls mehrheitlich tendentiell hypofunktional zeigten sich die Thrombozyten des Patienten P1. Mit Ausnahme der  $\alpha$ -Granula Sekretion befand sich die Thrombozytenaktivität überwiegend unterhalb des Niveaus der gesunden Kontrollprobanden (basal und nach Aktivierung unabhängig vom Agonisten) zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses. Im Laufe des 1.FU kam es zwar zu einer tendenziellen Besserung der thrombozytären Granulafreisetzung ( $\alpha$ -/ $\delta$ -Granula), jedoch zeigte sich die GPIIb/IIIa und VWF Bindung mit einer aggravierenden Tendenz der Hypofunktion. Letztere könnte auf ein Rezidiv des erworbenen VWS hindeuten, gemeinsam mit der Tatsache, dass die Thrombozyten-Konzentration (trotz HU) im Laufe des FU weiter anstieg. Um dies im Verlauf näher quantifizieren zu können, wäre eine Bestimmung der VWF Akt/Ag Ratio durchzuführen.

Mithilfe der Thrombozyten-Funktionsauswertung konnte der Blutungsphänotyp der ET bei diesen Patienten mit einem hypoaktiven Charakter der Thrombozyten näher erklärt werden.

## 5.2.2 Erhöhte Aktivierung und Hyperfunktion der Thrombozyten bei Patienten mit ET im 1.FU

### 5.2.2.1 Erhöhte P-Selektin Expression auf Thrombozyten bei Patienten mit ET und *JAK2 V617F* Mutation

CD62P (P-Selektin), welches bei Ausschüttung der  $\alpha$ -Granula auf die Oberfläche der Thrombozyten transloziert wird, ist bereits seit Langem als Marker für eine

thrombozytäre Aktivierung bekannt, z.B. bei Patienten mit akuten zerebrovaskulären Ischämien [139].

Ebenso wurde eine erhöhte basale Expression von CD62P auf Thrombozyten im peripheren Blut bei ET Patienten in früheren Studien beobachtet [29, 139]. Diese Erkenntnisse deckten sich mit meinen Ergebnissen vor allem bei Betrachtung der basalen CD62P-Expression. Auch hier exprimierten die Thrombozyten der 1.FU ET Patienten im Vergleich zu den gesunden Individuen mit einer statistischen Auffälligkeit vermehrt CD62P. Zudem zeigte sich die Convulxin (GPVI) induzierte CD62P Expression bei den ET Patienten leicht erhöht bzw. auf einem vergleichbaren Niveau wie die der Thrombozyten der Kontrollgruppe ohne ASS. Sowohl die vermehrte basale als auch GPVI vermittelte CD62P Expression war insbesondere bei den Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation zu sehen und weitestgehend unabhängig von der zytoreduktiven Therapie.

Coucelo et al. dokumentierten diese Assoziation bereits zwischen vermehrter basaler CD62P Expression und *JAK2 V617F* Mutation. Darüber hinaus zeigten sie eine vermehrte CD62P Expression nach Aktivierung via Arachidonsäure und Thrombin, eine GPVI-vermittelte Antwort wurde jedoch nicht untersucht.[28].

Da der *JAK2 V617F*- Mutationsstatus mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert ist [128], liegt der Schluss nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen thrombotischen Ereignissen und einer erhöhten Thrombozytenaktivierung durch eine erhöhte CD62P Expression *in vivo* gibt. In der Tat weisen in unserer Patientenkohorte nur die Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation eine Thromboseanamnese auf, nicht aber die mit einer *CALR* Mutation. Jedoch wurde dies bereits in früheren Studien untersucht, wo ein solcher Zusammenhang nicht bestätigt werden konnte [139, 140]. Darüber hinaus raten Villmow et al. zur Vorsicht vor voreiligen Schlussfolgerungen, denn eine erhöhte CD62P Expression muss nicht zwingend eine erhöhte „Klebrigkeit“ und eine damit einhergehende prokoagulatorische Tendenz bedeuten. Die Erhöhung der CD62P Expression ist zwar ein Zeichen für eine stattgefundene Aktivierung des Thrombozyten, allerdings kann dieser anschließend als aktivierter Thrombozyt im Gefäßsystem zirkulieren ohne zu aggregieren beziehungsweise an Gefäßwände andocken und eine Gerinnungskaskade auszulösen [141].

Allerdings könnte vermehrtes CD62P auf der Oberfläche von Thrombozyten die Interaktion mit Leukozyten, wie Monozyten und neutrophile Granulozyten,

unterstützen [139] und somit die Aktivierung der Leukozyten und damit inflammatorische Prozesse während der ET triggern. Die Untersuchung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten im peripheren Blut bei unseren 1.FU ET-Patienten wurde durch unsere Kooperationsarbeitsgruppe von Prof. M. Radsak (UM Mainz) untersucht und war nicht Gegenstand meiner Dissertation.

Auffällig ist, dass zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses die Thrombozyten der ET Patienten eine verminderte CD62P Expression nach Aktivierung über Convulxin aufwiesen und damit einen GPVI-Defekt andeuteten. Wie die Ergebnisse der 1.FU Untersuchung allerdings zeigen, kam es im Laufe des 1.FU bei nahezu allen ET-Patienten zu einer Verbesserung der thrombozytären Antwort auf eine GPVI-Stimulation. Diese war z.T. sogar erhöht im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Interessanterweise war eine ähnliche verbessernde Tendenz eines vermeintlichen GPVI-Defekts in der 1.FU Messung auch bei der thrombozytären CD63 Expression (wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben) zu erkennen, wobei diese noch unterhalb der der Kontrollgruppen blieb.

Eine mögliche Ursache dieser verbesserten Thrombozyten-Funktion war anhand der Charakteristika unseren Patientenkollektivs schwierig zu identifizieren: Denn diese Tendenz wurde nahezu unabhängig der zytoreduktiven Therapie (und damit auch der Thrombozyten-Konzentration) und auch des klinischen Verlaufs (betrifft auch Patienten mit einer Entwicklung einer Post-MF) beobachtet. Ein kleiner Unterschied fiel bei den Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation auf, diese zeigten eine tendenziell stärkere Verbesserung der thrombozytären Antwort auf eine Aktivierung über GPVI als die Patienten mit einer *CALR* Mutation. Ob daher eine thrombozytärer GPVI Defekt bei Patienten mit ET vorliegt und ob dieser darüber hinaus möglicherweise reversibel ist, wurde bislang nicht speziell untersucht und wäre ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Arbeiten.

Zusammenfassend konnte in unserer Studie eine vermehrte CD62P Expression auf der Thrombozyten-Oberfläche der 1.FU ET Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation sowohl basal als auch nach Agonisten-Aktivierung, v.a. über Convulxin, beobachtet werden.

### 5.2.2.2 Erhöhte PDI-Präsentation auf der Oberfläche der Thrombozyten bei Patienten mit ET

Ich konnte erstmals zeigen, dass Thrombozyten der 1.FU ET Patienten, vor allem bei denen mit einer *JAK2 V617F* Mutation unabhängig von der zytoreduktiven Therapie, vermehrt PDI auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu den gesunden Probanden präsentieren. In der 1.FU Untersuchung konnte ich sogar eine tendenziell höhere PDI-Oberflächenpräsentation auf den ET-Thrombozyten detektieren als bei Einschluss. Chen et al. Sowie Jurk et al. zeigten, dass die PDI durch eine thrombozytäre Aktivierung vermehrt auf der Oberfläche präsentiert wird [103, 142]. Somit könnte eine erhöhte PDI-Expression auf Thrombozyten von ET-Patienten als weiterer Marker von aktivierten Thrombozyten *in vivo* angesehen werden.

Eine andere mögliche Ursache der beobachteten erhöhten PDI-Levels auf den 1.FU ET-Thrombozyten könnte in dem vermehrten Auftreten von jungen und unreifen Thrombozyten liegen. Kehrel et al stellte die Hypothese im Rahmen eines „Commentary“ zu einem Artikel in JTH auf, dass bei jungen Thrombozyten möglicherweise ein vermehrter Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu einer verminderten Rekrutierung des Chaperons PDI im ER und stattdessen auf die Thrombozytenoberfläche transloziert wird [143]. Wie zuvor bereits erwähnt wurde, wäre tatsächlich vorstellbar, dass im Zuge der unkontrollierten Proliferation der Megakaryozyten, es zu einer gesteigerten Freisetzung von jungen, unreifen Thrombozyten in der ET kommen kann. Eine nähere Analyse von retikulierten Thrombozyten unserer ET-Patienten erfolgte nicht im Rahmen meiner Dissertation sondern im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jurk.

Als Fazit ist hier zu nennen, dass sich die PDI Präsentation auf der Oberfläche der Thrombozyten der 1.FU ET Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation erhöht und tendenziell erhöhter darstellt im Vergleich zu Untersuchungen im Ersteinschluss.

### 5.2.2.3 Erhöhtes MMP der Thrombozyten bei Patienten mit ET

Die Thrombozyten unserer ET-Patienten mit beiden Mutationsformen (*JAK2 V617F*, *CALR*) zeigten insbesondere zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung eine deutliche Erhöhung des MMP und damit eine Hyperpolarisation der inneren mitochondrialen Membran. In einer früheren Studie von Siewiere et. al wurde das Auftreten von

erhöhtem MMP in Thrombozyten diskutiert, allerdings in Assoziation mit der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus [144]. Hier machten sie die Beobachtung, dass bei einem erhöhten Glucosegehalt im Blut in Ratten (Hyperglykämie) es zu einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten, verdeutlicht über eine gesteigerte CD62P Expression, und einer Hyperpolarisation der inneren mitochondrialen Membran kam. In anderen Arbeiten von Matarrese et al. konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen Aktivierung und mitochondrialer Hyperpolarisation bei T-Lymphozyten beobachtet werden [99, 145]. Anhand dieser Beobachtungen könnte man vermuten, dass auch bei Thrombozyten eine Erhöhung des MMP als Aktivierungsmarker in Betracht gezogen werden kann.

Interessanterweise sank das thrombozytäre MMP im Laufe des 1.FU mehrheitlich (unabhängig des Mutationsstatus) deutlich ab, teilweise wurde dabei das Niveau der gesunden Kontrollreferenzen sogar unterschritten. Mehrere vergangene Studien zeigten, dass ein starkes Absinken des MMP, also eine Depolarisation des MMP, als Indikator für einen programmierten Zelltod, der sog. Apoptose, gesehen werden kann [146-148]. Zudem postulierten Rand et al, dass Thrombosen mit einer verkürzten Lebensdauer von Thrombozyten assoziiert wird [149]. Damit könnte man die Vermutung stellen, dass prothrombotische Thrombozyten auch mit einem präapoptischen Zustand einhergehen können.

Insgesamt könnten daher die extremen Schwankungen des MMP (Hyper- und Depolarisation) für eine gesteigerte thrombozytäre Aktivierung sprechen. Um dies allerdings weiter verifizieren zu können, bedarf es weitere Untersuchung auf das mitochondriale Verhalten der Thrombozyten bei Patienten mit ET. Interessant wäre dabei zudem, die Beurteilung des MMP und der Apoptose basal im Vergleich zur Aktivierung über Thrombozyten *in vitro*.

#### 5.2.2.4 Exemplarische Patienten der ET Kohorte mit hyperaktiven Thrombozyten-Profil

Repräsentativ für eine tendenziell hyperaktive Thrombozytenfunktion stehen die Patienten P3 und P8. Beide wiesen eine *JAK2 V617F* Mutation auf und bei beiden kam es in der Vergangenheit zu thrombotischen Ereignissen (Lungenembolie, akuter arterieller Extremitätenverschluss, Zentralarterienverschluss). Zum Zeitpunkt der Untersuchungen (Ersteinschluss, 1.FU) erhielt der Patient P3 durchgehend eine

Zytoreduktion mit HU. Hingegen wurde HU bei der Patientin P8 sowohl zum Zeitpunkt des Ersteinschlusses sowie des 1.FU pausiert aufgrund einer unklaren Hepatopathie (nach Ausschluss einer medikamentös-toxisch induzierten Hepatitis wurde HU erneut verabreicht). Darüber hinaus erhielten beide eine Begleitmedikation mit ASS. Die Thrombozyten-Konzentration verhielt sich bei dem Patienten P3 tendenziell fallend ( $405 \times 10^9/L$  auf  $344 \times 10^9/L$ ), wohingegen sie bei der Patientin P8 sich nahezu verdoppelt hatte ( $281 \times 10^9/L$  auf  $401 \times 10^9/L$ ). Letzteres könnte auf die Unterbrechung der HU Therapie zurückzuführen sein.

Die Untersuchung der Thrombozytenfunktion zeigte bei beiden Patienten die gleiche Tendenz: Die Thrombozyten waren sowohl im basalen Zustand als auch nach Agonisten-induzierter Aktivierung tendenziell aktiver im 1.FU als im Vergleich zum Ersteinschluss. Insbesondere bei Betrachtung der  $\alpha$ -Granula-Sekretion und der PDI Oberflächensekretion führte diese Aktivitätssteigerung zu einem Überschreiten der Referenzen der gesunden Kontrollprobanden (siehe PDI-Expression von P3). In den restlichen Assays konnte zwar auch eine Annäherung an die Kontrollreferenz erreicht werden (CD63, LAMP-1, PAC-1), jedoch blieb die Thrombozytenaktivität der beiden Patienten dabei unterhalb der Kontrollreferenz. Letzteres lässt darauf deuten, dass eine zytoreduktive Therapie nicht zwingend zu einer Normalisierung der Thrombozytenfunktion führt. Oyarzún et al. stellen ebenfalls in ihrem Review dar, dass der Einfluss von einer Zytoreduktion auf die Aktivität der Thrombozyten teilweise ambivalent ist [150]. So wurde auf der einen Seite beobachtet, dass keine Veränderung der thrombozytären Aktivierung zwischen einer Therapie mit Zytoreduktion und ohne aufgetreten seien [151]. Auf der anderen Seite postulierten Giordano et al, dass HU die CD62P getriggerte thrombozytäre Aktivierung hemme und Einfluss auf Thrombozyten-Neutrophile Aggregate habe [152]. Obwohl der Nutzen der zytoreduktiven Therapie zur Reduktion des Thromboserisiko oft bestätigt wurde, ist bislang der Einfluss von HU auf die thrombozytäre Funktion nur wenig untersucht und wäre daher ein interessanter Aspekt für zukünftige Untersuchungen.

Abschliessend ist die Patientin P7 zu nennen. Diese weist als Besonderheit sowohl thrombotische Ereignisse (zweimalige TIA) als auch eine Blutungsanamnese (Z.n. gynäkologischer Blutung) auf. Zudem wurde in der Vergangenheit ein mildes erworbenes VWS diagnostiziert, welches in den Kontrolluntersuchungen zum Zeitpunkt der Studie nicht mehr im Zentrallabor nachgewiesen werden konnte. Auch bei dieser Patientin wurde eine *JAK2* V617F Mutation nachgewiesen, was erneut

darauf hinweist, dass aufgrund dieser Mutation ein erhöhtes Thromboserisiko besteht [128]. Therapeutisch erhielt sie bis auf ASS jedoch keine zytoreduktive Therapie, da sie diese abgelehnt hatte. Laboranalytisch zeigen sich entsprechend erhöhte Thrombozytenkonzentrationen mit einer steigenden Tendenz im Verlauf des 1.FU ( $599 \times 10^9/L$  auf  $732 \times 10^9/L$ ). Auffällig war, dass die Thrombozytenreaktivität sowohl basal als auch nach Agonistenzugabe überdurchschnittlich hoch war: Vor allem die Freisetzung der drei thrombozytären Granula ( $\alpha$ -Granula,  $\delta$ -Granula und lysosomale Granula) und auch die PDI Oberflächenexpression zeigte sich im 1.FU nicht nur höher im Vergleich zum Vorjahr, sondern überschritt dabei z.T. sehr stark das Aktivitätsniveau der gesunden Kontrollprobanden. Allein die basale VWF-Aktivität und das MMP hatten eine fallende Tendenz und fielen unterhalb des Niveaus der Kontrollprobanden. Die reduzierte basale VWF-Aktivität könnte in Zusammenhang mit dem in der Vergangenheit bestandenen VWS stehen (mögliches Residuum).

Diese Ambivalenz der ET zwischen klinischer Ausprägung von Thrombose und Blutung sowie experimentell in Form von zugleich hypo- als auch hyper-aktiven Thrombozyten wird an diesem Beispiel besonders deutlich. Damit verbunden wird eine therapeutische Entscheidungsfindung zur Herausforderung. In diesem Fall bei Patientin P7 würde sie gemäss den aktuellen Therapierichtlinien von 2019 in die Hochrisikogruppe fallen und theoretisch wäre daher eine zytoreduktive Therapie indiziert. Auch die Thrombozytenfunktions-Analyse deutet insgesamt auf eine eher hyperaktive Tendenz der Thrombozyten auf.

### 5.3 Besondere Veränderungen der Thrombozyten-Funktion bei Patienten mit ET im 1.FU im Vergleich zum Ersteinschluss

Auffälligkeiten waren bei dem Patient P4 zu finden. Molekulargenetisch wies dieser eine *JAK2* V617F Mutation auf und anamnestisch ließ sich ein einmaliges Blutungsereignis eruieren (Divertikelblutung 2006). Die Laboruntersuchungen zeigten jedoch keine Hinweise auf ein erworbenes VWS (VWF Akt/ VWF Agt Ratio  $>0,7$ ) und auch die Thrombozyten-Konzentrationen lagen zu beiden Untersuchungszeitpunkten im Normbereich ( $329 \times 10^9/L$  und  $353 \times 10^9/L$ ). Therapeutisch erhielt dieser Patient bereits seit über 10 Jahren durchgehend HU ohne Begleitmedikation (kein ASS).

In Bezug auf die Thrombozyten-Funktionsanalyse zeigte dieser eine deutliche hyperaktive Tendenz. Dies war insbesondere in der 1.FU Untersuchung in der  $\alpha$ - und

$\delta$ - und lysosomale Granulafreisetzung (CD62P, CD63, LAMP-1) sowie in der direkten GPIIb/IIIa Rezeptoraktivität (PAC-1) zu sehen, wobei das Niveau der Kontrollreferenz ohne ASS größtenteils überschritten wurde. Diese hyperfunktionale Tendenz könnte sicherlich durch die Tatsache erklärt werden, dass dieser Patient als einziger der Patienten ohne Therapiewechsel kein ASS eingenommen hatte. Eine andere denkbare Erklärung könnte sein, dass dieser Patient unter HU eine Remission entwickelt hat. Formal erfüllt dieser Patient Kriterien einer Remission:

- dauerhafte Beschwerdefreiheit, inklusive Fehlen einer tastbaren Hepatosplenomegalie
- dauerhafte Blutbildnormalisierung mit einer Thrombozyten-Konzentration  $\leq 400 \times 10^9/L$ , Leukozyten-Konzentration  $< 10 \times 10^9/L$ , Fehlen von Blasten
- keine Zeichen einer Krankheitsprogression, Absenz von hämorrhagischen und thrombotischen Ereignissen (Patient berichtet, seit über zehn Jahren symptomfrei zu sein)

Um dies weiter beurteilen/verifizieren zu können und überdies entsprechend zwischen einer kompletten und partiellen Remission differenzieren zu können, wäre eine weitere Knochenmarkspunktion notwendig. Dass unter HU Therapie eine Remission möglich ist, beschrieb bereits Ricksten et al. [153, 154].

Bei den Patienten P10 bzw. P12 kam es im Laufe des 1.FU zu einer Therapieumstellung von HU auf Anagrelid bzw. IFN- $\alpha$  aufgrund des Auftretens von dermatologischen Komplikationen (Juckreiz, Basaliome). Eine Langzeit Anwendung von HU ist bereits bekanntermaßen assoziiert mit mukokutanen Veränderungen [55], welche von milden (Hyperpigmentierung, Alopezia, Nagelveränderungen) bis hin zu schweren und unangenehmen Toxizitäten (Hautulzerationen, Hautinfiltrationen, Gangrän) reichen können [155]. Mit einer Inzidenz von 5% zählen diese eher zu den seltenen unerwünschten Wirkungen von HU, führen jedoch zu einem Therapieabbruch/-umstellung. Die Pathogenese der HU assoziierten Hautveränderungen ist noch unklar. In unserem Patientenkollektiv trat dies bei sowohl *JAK2 V617F* (P10) als auch *CALR* (P12) mutierten Patienten auf.

In Bezug auf die therapeutische Umstellung präsentierten sich die Patienten sowohl vor als auch nach dem Wechsel auf Anagrelid bzw. IFN- $\alpha$  klinisch oligosymptomatisch (P10, gelegentlicher Schwindel, milde Blutungsneigung) bzw. asymptomatisch (P12) in Bezug auf deren hämatologischen Grunderkrankung. Beide Patienten erhielten

neben der zytoreduktiven Therapie gleichzeitig eine Therapie mit ASS. Auch laborchemisch zeigte sich die Ausprägung der ET diskret bei nur moderat erhöhten Thrombozytenkonzentrationen, welche trotz Therapieumstellung nahezu konstant blieb im Laufe des 1.FU.

Bei dem Patienten P12, der eine Umstellung auf IFN- $\alpha$  erhielt, zeigte sich auch die Thrombozytenfunktionsanalyse in den mehrheitlichen Parametern im 1.FU tendenziell unverändert hypofunktional im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (siehe CD63, LAMP-1, PAC-1, Fibrinogen-Bindung, VWF-Bindung). Eine Ausnahme bildete dabei die thrombozytäre CD62P Expression (basale und nach Agonisten-Aktivierung), welche im 1.FU tendenziell höher war als im Ersteinschluss und damit z.T. eine Annäherung an die Kontrollgruppen erreicht wurde. Bei dem Patienten P10, der im 1.FU auf Anagrelid wechselte, war hingegen eine tendenzielle Normalisierung der Thrombozytenfunktion zu beobachten (siehe CD62P, CD63, LAMP-1, PAC-1), bis auf die Ergebnisse der Fibrinogen- und VWF-Bindung. Letztere beide wiesen eine starke hypofunktionale Tendenz auf, die nicht zuletzt durch die im Laufe des 1.FU erfolgten Chargenwechsel des Fibrinogens bzw. VWF-AK zum einen erklärt werden könnte.

Dadurch, dass sowohl die Thrombozytenkonzentration als auch die thrombozytäre Funktion unter der Therapie von Anagrelid bzw. IFN- $\alpha$  überwiegend unverändert, bzw. teilweise sogar zu einer Besserung führte, verdeutlicht die Wirksamkeit der Zweitlinien Therapien.

Zuletzt entwickelten zwei der Patienten (P9, P13) eine Post-MF im Sinne eines Progresses der ET. Diese ist gekennzeichnet durch einen Untergang des blutbildenden Knochenmarks mit initialer Leukozytose und anschließender Panzytopenie sowie einer Splenomegalie mit extramedullärer Blutbildung und Ausschemmung von Blasten (Vorstufen der Blutzellen) ins periphere Blut [1].

Der Patient P13 wies initial bei Ersteinschluss an ET-Symptomatik eine erhöhte Blutungsneigung auf, der Krankheitsprogress fiel im Laufe des 1.FU durch sinkende Thrombozyten ( $615 \times 10^9/L$  auf  $301 \times 10^9/L$ ) - Konzentrationen sowie einer diskreten Splenomegalie auf. Im Gegensatz dazu zeigte der Patient P9 zu Beginn bereits eine starke Ausprägung der Erkrankung mit einer Blutungs-Thrombose- und MZS-Anamnese. Im Laufe des 1.FU trat bei dem Patienten P9 auch eine deutliche Reduktion der Thrombozyten-Konzentration ( $973 \times 10^9/L$  auf  $224 \times 10^9/L$ ) auf,

zusätzlich fiel die Post-ET-MF durch eine progrediente Leukozytose und Nachweis eines Blasten im peripheren Blutbild auf.

In beiden Fällen führte der rasche Thrombozyten-Abfall zu einem Absetzen von HU. Da bei beiden Patienten insgesamt ein niedriger DIPSS Score vorlag, bestand bislang keine Indikation zur weiteren Therapie mit Ruxolitinib, einem JAK2-Kinase-Inhibitor, bzw. einer allogenen Stammzelltransplantation.

Die Thrombozyten-Funktionsanalyse dieser Patienten ergab eine insgesamt verschlechternde, hypoaktive Tendenz sowohl im basalen Zustand als auch nach Agonisten-Aktivierung im Vergleich zum Ersteinschluss (siehe CD62P, CD63, LAMP-1, VWF). Dies findet Übereinstimmung in den Ergebnissen der Arbeit von Alvarez-Larrán et al., in der ebenfalls beobachtet wurde, dass Patienten mit einer MF eine geringer Thrombozyten- Aktivierung aufwiesen als die ET Patienten [156].

Da beide Patienten eine initiale Therapie mit HU erhielten, wirft dies die Frage auf, ob hier ein Zusammenhang bestehen könnte. In der Tat wird die leukämische Transformation in der ET, welche in 1,1%- 9,3% der Fälle auftreten kann, kontrovers diskutiert. Als potentiell mutagener Wirkstoff wurden bereits einige Fälle von leukämischer Transformation unter HU in der ET berichtet [157]. Andere hingegen vertreten die Meinung, dass das Progressionsrisiko unter HU relativ gering sei [158]. Vielmehr sehen sie die Post-ET-MF als eine intrinsische Eigenschaft der Erkrankung an sich und damit als eine natürliche Entwicklung. Darüber hinaus postulierte Gangat et. al, dass auch andere Risikofaktoren zu einer leukämischen Transformation, wie Nikotinabusus, Alter über 60 Jahre, Thromboseanamnese und Leukozytose, führen können und miteinbezogen werden sollten [159]. So weisen auch die Patienten P9 (Leukozytose, Thromboseanamnese) und P10 (Nikotinabusus, Alter über 60 Jahre) einige dieser Risikofaktoren auf. Ob HU nun bei diesen Patienten mit Gewissheit die Post-ET-MF zur Folge hatte, bleibt unklar. Was jedoch bereits mehrfach bestätigt wurde, ist dessen Wirksamkeit in Bezug auf eine Reduktion der Thrombozyten-Konzentration und des Thromboserisikos [7, 61]. Einmal mehr wird deutlich, dass die Behandlung der ET ein schwieriger Kompromiss zwischen Abwägung des Thrombose- und Blutungsrisikos und der Notwendigkeit einer potentiell mutagenen Therapie ist.

Interessanterweise trat die Post-ET-MF sowohl bei einer *JAK2* V617F Mutation als auch *CALR* Mutation (Typ 2) auf, sodass man die Vermutung stellen könnte, dass die Progression unabhängig des Mutationsstatus sei. Diese findet in der Arbeit von Rumi

et al. Bestätigung, in der sie behaupten, dass beide dieser Mutationsformen ein erhöhtes Progressionsrisiko aufweisen [3].

## 6 Zusammenfassung

In dieser Dissertation erfolgte eine durchflusszytometrische Funktionsanalyse der Thrombozyten von Patienten mit ET im 1. Follow-Up nach einem Jahr nach Ersteinschluss im Vergleich zu Kontrollprobanden mit und ohne ASS. Dabei lag der Fokus auf der Untersuchung der Thrombozyten-Funktion bei ET Patienten des 1.FU-Kollektivs bezogen auf den Mutationsstatus in Gruppen. Außerdem habe ich meine Ergebnisse aus dem 1.FU intra-individuell in Relation zu den von Charlotte H. in ihrer Dissertation erhobenen Ergebnissen der ET-Patienten beim Ersteinschluss betrachtet. Die klinische Charakterisierung fiel insbesondere durch das Auftreten von einer Krankheitsprogression (Post-MF) im Laufe des 1.FU in zwei Fällen auf, neue Blutungs- oder Thromboseergebnisse traten nicht auf. Der Verlauf der Thrombozyten-Konzentration unter zytoreduktiver Therapie zeigte sich im Laufe des 1.FU tendenziell fallend, wohingegen die Patienten ohne Therapie eine erhöhte bzw. tendenziell steigende Thrombozyten-Konzentration aufwiesen.

Die Thrombozyten-Funktionsanalyse wurde sowohl von einer differenzierten hyper- als auch hypoaktiven Tendenz der Thrombozyten der Patienten im 1.FU geprägt: Die thrombozytäre Hypofunktion äußerte sich in einem potentiellen quantitativen  $\delta$ -SPD sowie einer lysosomalen Störung bei verminderten Oberflächen-Expressionen von basalen und Agonisten-induzierten CD63, LAMP-1 sowie bei verminderter Mepacrine-Aufnahme, welche tendenziell unverändert vermindert im Vergleich zum Ersteinschluss war. Zudem deuten meine Ergebnisse auf einen Defekt der GPIIb/IIIa-Aktivierung und der VWF-Bindungskapazität hin. Letzteres zeigte sich eindrücklich bei einer Patientin (P5), deren verminderte VWF-Bindung am ehesten durch ein erworbenes VWS bei extremer Thrombozytose zu erklären wäre, begleitend von einer anamnestischen Blutungsneigung. Interessanterweise fiel in der 1.FU-Untersuchung eine Besserung der Agonisten-induzierten thrombozytären VWF-Bindung bei gleichzeitig fallender Thrombozyten-Konzentration auf. Zukünftige Verlaufsuntersuchungen zur Thrombozytenfunktion bei dieser Patientin könnten Aufschluss über die klinische Ausprägung sowie Entwicklung eines möglichen erworbenen VWS bei der ET geben.

Auffällig war, dass in der initialen Untersuchung von Charlotte H. die Ergebnisse zur CD63 und CD62P-Oberflächen-Expression auf einen thrombozytären GPVI-Defekt hinwiesen. Im 1.FU kam es jedoch zu einer erhöhten GPVI-vermittelten  $\alpha$ -Granulasekretion, die z.T. die Kontrollgruppen überstieg und damit eine hyperreaktive

Tendenz spezifischer Thrombozytenfunktionen beschreibt. Die thrombozytäre CD63 Expression blieb zwar im 1.FU weiterhin unterhalb der der Kontrollreferenzen, zeigte allerdings ebenfalls eine steigende bzw. verbessernde Tendenz. Inwieweit ein thrombozytärer GPVI Defekt bei Patienten mit ET vorliegt und darüber hinaus, ob ein solcher möglicherweise reversibel ist, wäre daher eine sehr interessante Fragestellung für weitere Studien.

Zudem konnte ich einen tendenziellen Anstieg in der vermehrten thrombozytären PDI Oberflächenpräsentation ex vivo im Laufe des 1.FU bei dem ET-Kollektiv zeigen. Dies fiel vermehrt bei Patienten mit einer *JAK2 V617F* Mutation und thromboembolischer Anamnese unabhängig von der zytoreduktiven Therapie auf, dessen Thrombozyten ebenfalls eine gesteigerte CD62P Oberflächen-Expression basal und nach Aktivierung mit Convulxin zeigten.

Ob die vermehrte PDI Präsentation auf Thrombozyten einen neuen Thrombozyten-Aktivierungsmarker bei der ET darstellt und die thrombozytäre Reaktivität bei der ET moduliert, müssen zukünftige prospektive Studien zeigen. Andererseits wiesen die Thrombozyten der ET Patienten ein erhöhtes MMP im Vergleich zu den Kontrollreferenzen auf unabhängig vom Mutationsstatus und einer Therapie mit HU. Bezüglich des MMP war auffällig, dass im Ersteinschluss eine starke Erhöhung des MMP beobachtet wurde, wohingegen es im 1.FU stark absank. Ob diese starken Schwankungen des MMP für eine gesteigerte thrombozytäre Aktivierung sprechen, muss in weiteren Arbeiten evaluiert werden. Untersuchungen zur funktionalen Rolle der PDI auf der Thrombozytenoberfläche als auch zum thrombozytären MMP stellen daher vielversprechende Ansätze dar, um die Thrombozyten-Dysfunktion bei der Pathogenese der ET besser zu verstehen und um neuartige Thrombozyten-Funktionsmarker zu etablieren.

Diese Heterogenität im Thrombozyten-Phänotyp bei ET Patienten betont die therapeutischen Herausforderungen und die Notwendigkeit einer personalisierten Therapie. Obwohl die ET mit einer relativ hohen Überlebenschancen vergesellschaftet ist, sind die Komplikationen ebenso unvorhersehbar wie zum Teil lebensbedrohlich. Zudem ist eine Krankheitsprogression möglich, wie sie auch in unserer ET Kohorte in Form einer Post-ET-MF auftrat, die von da an mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist.

Diese Arbeit beschreibt erstmals differenzierte und neue Unterschiede in der Thrombozyten-Funktion im Verlauf der ET, die mit bereits bekannten und mit vielversprechenden neuen Funktionsparametern durchflusszytometrisch untersucht wurden. Diese gemeinsam mit weiteren Analysen wie z.B. die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion und das Verhalten unreifer Thrombozyten im Verlauf der ET könnten weiter Aufschluss über die Pathogenese sowie individuelle Risikofaktoren der ET geben. Für das Verständnis der ET bildet die differenzierte Analyse der komplexen Thrombozyten-Funktionen eine wichtige Grundlage.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Herold, G., *Innere Medizin*, ed. G. Herold. 2018, Köln, Germany: Gerd Herold.
2. Tefferi, A., *The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek*. *Leukemia*, 2008. **22**(1): p. 3-13.
3. Rumi, E. and M. Cazzola, *Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2017. **129**(6): p. 680-692.
4. McMullin, M.F., B.S. Wilkins, and C.N. Harrison, *Management of polycythaemia vera: a critical review of current data*. *Br J Haematol*, 2016. **172**(3): p. 337-49.
5. Tefferi, A., *Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. *Am J Hematol*, 2016. **91**(12): p. 1262-1271.
6. Dao, K.T., *Myelodysplastic Syndromes: Updates and Nuances*. *Med Clin North Am*, 2017. **101**(2): p. 333-350.
7. Tefferi, A. and T. Barbui, *Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management*. *Am J Hematol*, 2019. **94**(1): p. 133-143.
8. Gilbert, H.S. and W. Dameshek, *The myeloproliferative disorders*. *Dis Mon*, 1970: p. 1-52.
9. Kaushansky, K., *Thrombopoiesis*. *Semin Hematol*, 2015. **52**(1): p. 4-11.
10. Cazzola, M., *Mutant calreticulin: when a chaperone becomes intrusive*. *Blood*, 2016. **127**(10): p. 1219-21.
11. Arnemann, J., *Driver-Mutation*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 729-729.
12. Vainchenker, W. and R. Kralovics, *Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2017. **129**(6): p. 667-679.
13. Levine, R.L., et al., *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 387-97.
14. Baxter, E.J., et al., *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. *Lancet*, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
15. Babon, J.J., et al., *The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation*. *Biochem J*, 2014. **462**(1): p. 1-13.
16. Bennett, M. and D.F. Stroncek, *Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases*. *J Transl Med*, 2006. **4**: p. 41.
17. Kralovics, R., et al., *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
18. Toppaldoddi, K.R., et al., *Rare type 1-like and type 2-like calreticulin mutants induce similar myeloproliferative neoplasms as prevalent type 1 and 2 mutants in mice*. *Oncogene*, 2019. **38**(10): p. 1651-1660.
19. Lu, Y.C., W.C. Weng, and H. Lee, *Functional roles of calreticulin in cancer biology*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 526524.
20. Beer, P.A., et al., *MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort*. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 141-9.
21. Rampal, R., et al., *Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(50): p. E5401-10.
22. Stegelmann, F., et al., *High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations*. *Haematologica*, 2010. **95**(4): p. 666-9.

23. Quivoron, C., et al., *TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(1): p. 25-38.
24. Kameda, T., et al., *Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator*. *Blood*, 2015. **125**(2): p. 304-15.
25. Vannucchi, A.M., et al., *Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal*. *Leukemia*, 2008. **22**(7): p. 1299-307.
26. Griesshammer, M., et al., *Essenzielle Thrombozythämie*. *Dtsch Arztebl International*, 2007. **104**(34-35): p. A-2341.
27. Elliott, M.A. and A. Tefferi, *Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(3): p. 275-90.
28. Barbui, T. and A. Falanga, *Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms*. *Thromb Res*, 2016. **140 Suppl 1**: p. S71-5.
29. Pedersen, O.H., et al., *Platelet characteristics in patients with essential thrombocytosis*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018. **94**(6): p. 918-927.
30. Anger, B.R., et al., *Budd-Chiari syndrome and thrombosis of other abdominal vessels in the chronic myeloproliferative diseases*. *Klin Wochenschr*, 1989. **67**(16): p. 818-25.
31. Colombi, M., et al., *Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. A retrospective study of 103 patients*. *Cancer*, 1991. **67**(11): p. 2926-30.
32. van Genderen, P.J., et al., *Acquired von Willebrand disease in myeloproliferative disorders*. *Leuk Lymphoma*, 1996. **22 Suppl 1**: p. 79-82.
33. Finazzi, G., U. Budde, and J.J. Michiels, *Bleeding time and platelet function in essential thrombocythemia and other myeloproliferative syndromes*. *Leuk Lymphoma*, 1996. **22 Suppl 1**: p. 71-8.
34. Mazzucato, M., et al., *Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative disorders: decrease in glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function*. *Br J Haematol*, 1989. **73**(3): p. 369-74.
35. Moore, S.F., et al., *Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin alpha(IIb)beta(3) pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia*. *Blood*, 2013. **121**(7): p. 1209-19.
36. Finazzi, G., *Ruxolitinib in ET: not all MPN are equal*. *Blood*, 2017. **130**(17): p. 1873-1874.
37. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
38. Tefferi, A. and T. Barbui, *Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(2): p. 162-73.
39. Rottenstreich, A., et al., *Assessment of procoagulant potential in patients with reactive thrombocytosis and its association with platelet count*. *Eur J Haematol*, 2018. **100**(3): p. 286-293.
40. Appleby, N. and D. Angelov, *Clinical and laboratory assessment of a patient with thrombocytosis*. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2017. **78**(10): p. 558-564.
41. Dingli, D. and A. Tefferi, *A critical review of anagrelide therapy in essential thrombocythemia and related disorders*. *Leuk Lymphoma*, 2005. **46**(5): p. 641-50.
42. Tefferi, A., *Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances*. *Am J Hematol*, 2016. **91**(1): p. 50-8.

43. Barbui, T., et al., *Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia*. *Blood Cancer J*, 2015. **5**: p. e369.
44. Matzdorff, A., *Platelet function tests and flow cytometry to monitor antiplatelet therapy*. *Semin Thromb Hemost*, 2005. **31**(4): p. 393-9.
45. Capodanno, D. and D.J. Angiolillo, *Aspirin for Primary Cardiovascular Risk Prevention and Beyond in Diabetes Mellitus*. *Circulation*, 2016. **134**(20): p. 1579-1594.
46. Schror, K., *Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis*. *Semin Thromb Hemost*, 1997. **23**(4): p. 349-56.
47. Liste, G. *Acetylsalicylsäure*. Available from: <https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Acetylsalicylsaeure> 41.
48. Bhatt, D.L., et al., *Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(16): p. 1706-17.
49. De Stefano, V., et al., *The Aspirin Regimens in Essential Thrombocythemia (ARES) phase II randomized trial design: Implementation of the serum thromboxane B2 assay as an evaluation tool of different aspirin dosing regimens in the clinical setting*. *Blood Cancer J*, 2018. **8**(6): p. 49.
50. Koudstaal, P.J. and A. Koudstaal, *Neurologic and visual symptoms in essential thrombocythemia: efficacy of low-dose aspirin*. *Semin Thromb Hemost*, 1997. **23**(4): p. 365-70.
51. Chapman, J. and J.K. Arnold, *Reye Syndrome*, in *StatPearls*. 2019, StatPearls Publishing  
StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
52. Madaan, K., D. Kaushik, and T. Verma, *Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. **12**(1): p. 19-29.
53. Finazzi, G., et al., *Second malignancies in patients with essential thrombocythaemia treated with busulphan and hydroxyurea: long-term follow-up of a randomized clinical trial*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(3): p. 577-83.
54. Cortelazzo, S., et al., *Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(17): p. 1132-6.
55. Jinna, S. and P.B. Khandhar, *Hydroxyurea Toxicity*, in *StatPearls*. 2019, StatPearls Publishing  
StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
56. Asano, Y. and A. Okaniwa, *In utero morphological effects of hydroxyurea on the fetal development in Sprague-Dawley rats*. *Jikken Dobutsu*, 1987. **36**(2): p. 143-9.
57. Harrison, C.N., et al., *Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide*. *Blood*, 2017. **130**(17): p. 1889-1897.
58. Elliott, M.A. and A. Tefferi, *Interferon-alpha therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia*. *Semin Thromb Hemost*, 1997. **23**(5): p. 463-72.
59. Greist, A., *The role of blood component removal in essential and reactive thrombocytosis*. *Ther Apher*, 2002. **6**(1): p. 36-44.
60. Watson, S.P. and A. Dalby, *Anagrelide is an anti-megakaryocytic and not an anti-platelet agent*. *Platelets*, 2019. **30**(1): p. 136-137.
61. Harrison, C.N., et al., *Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(1): p. 33-45.
62. Gisslinger, H., et al., *Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial*. *Blood*, 2013. **121**(10): p. 1720-8.

63. Renso, R., et al., *Long-term and low-dose of busulfan is a safe and effective second-line treatment in elderly patients with essential thrombocythemia resistant or intolerant to hydroxyurea*. Blood Cancer J, 2018. **8**(6): p. 56.
64. Grima, K.M., *Therapeutic apheresis in hematological and oncological diseases*. J Clin Apher, 2000. **15**(1-2): p. 28-52.
65. Barosi, G., et al., *Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4778-81.
66. Tefferi, A., A.M. Vannucchi, and T. Barbui, *Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018*. Blood Cancer J, 2018. **8**(1): p. 2.
67. Sodergren, A.L. and S. Ramstrom, *Detection of Lysosomal Exocytosis in Platelets by Flow Cytometry*. Methods Mol Biol, 2017. **1594**: p. 191-203.
68. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857.
69. Lefrancais, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
70. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[Platelets and the new comprehension of haemostasis]*. Hamostaseologie, 2005. **25**(1): p. 39-49.
71. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation]*. Dtsch Med Wochenschr, 2008. **133**(21): p. 1130-5.
72. Hvas, A.M., *Platelet Function in Thrombosis and Hemostasis*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 183-4.
73. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[Pathophysiology and biochemistry of platelets]*. Internist (Berl), 2010. **51**(9): p. 1086, 1088-92, 1094.
74. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
75. Jurk, K., 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): p. 1490-2.
76. Li, R. and J. Emsley, *The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(4): p. 605-14.
77. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Thrombozytensekretion*, in *Hämostaseologie*, B. Pötzsch and K. Madlener, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 67-72.
78. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(4): p. 381-92.
79. Singbartl, K., S.B. Forlow, and K. Ley, *Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure*. Faseb j, 2001. **15**(13): p. 2337-44.
80. Durrant, T.N., M.T. van den Bosch, and I. Hers, *Integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling*. Blood, 2017. **130**(14): p. 1607-1619.
81. Ahmad, S.S., R. Rawala-Sheikh, and P.N. Walsh, *Comparative interactions of factor IX and factor IXa with human platelets*. J Biol Chem, 1989. **264**(6): p. 3244-51.
82. Manglik, A. and A.C. Kruse, *Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation*. Biochemistry, 2017. **56**(42): p. 5628-5634.
83. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
84. Dorsam, R.T. and S.P. Kunapuli, *Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation*. J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 340-5.

85. Andre, P., et al., *P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 398-406.
86. Knezevic, I., C. Borg, and G.C. Le Breton, *Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 26011-7.
87. Dale, G.L., et al., *Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 175-9.
88. Jurk, K., *Analysis of platelet function and dysfunction*. Hamostaseologie, 2015. **35**(1): p. 60-72.
89. Rand, M.L., R. Leung, and M.A. Packham, *Platelet function assays*. Transfus Apher Sci, 2003. **28**(3): p. 307-17.
90. Brass, L.F., *Thrombin and platelet activation*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 18s-25s.
91. Makhoul, S., et al., *Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets*. Nitric Oxide, 2018. **76**: p. 71-80.
92. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson, *Platelet collagen receptors*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 189-97.
93. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc $\alpha$ R and the natural killer receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29019-24.
94. Miura, Y., et al., *Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46197-204.
95. Dale, G.L., *Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): p. 2185-92.
96. Alberio, L., et al., *Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1694-702.
97. Szasz, R. and G.L. Dale, *Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2827-31.
98. Dale, G.L. and P. Friese, *Bax activators potentiate coated-platelet formation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(12): p. 2664-9.
99. Perl, A., et al., *Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 360-7.
100. Leytin, V., *Apoptosis in the anucleate platelet*. Blood Rev, 2012. **26**(2): p. 51-63.
101. Matarrese, P., et al., *Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A--activation and long-term commitment to cell death*. Febs j, 2009. **276**(3): p. 845-56.
102. Remenyi, G., et al., *Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 467-71.
103. Jurk, K., et al., *Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(11): p. 2278-90.
104. Ohba, H., T. Harano, and T. Omura, *Biosynthesis and turnover of a microsomal protein disulfide isomerase in rat liver*. J Biochem, 1981. **89**(3): p. 901-7.
105. Essex, D.W., K. Chen, and M. Swiatkowska, *Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2168-73.

106. Lahav, J., et al., *Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2472-8.
107. Michelson, A.D., et al., *Evaluation of platelet function by flow cytometry*. Methods, 2000. **21**(3): p. 259-70.
108. Pasalic, L., *Assessment of Platelet Function in Whole Blood by Flow Cytometry*. Methods Mol Biol, 2017. **1646**: p. 349-367.
109. White, J.G., G.H. Rao, and J.M. Gerrard, *Effects of the Ionophore A23187 on blood platelets I. Influence on aggregation and secretion*. Am J Pathol, 1974. **77**(2): p. 135-49.
110. Frontroth, J.P. and E.J. Favalaro, *Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies*. Methods Mol Biol, 2017. **1646**: p. 473-494.
111. Ramstrom, S., et al., *Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives?* Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 268-81.
112. Perelman, A., et al., *JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e430.
113. plc, A. *JC-1 - Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit*. 2019-03-19; Available from: <https://www.abcam.com/jc-1-mitochondrial-membrane-potential-assay-kit-ab113850.html#top-412>.
114. Biomolecules, F. *JC-1 Mitochondrial fluorescent probe*. 2019; Available from: <https://focusbiomolecules.com/jc-1-mitochondrial-fluorescent-probe/>.
115. Santos, M.T., et al., *Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(4): p. 615-21.
116. Valles, J., et al., *Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3978-84.
117. Fersht, A.R. and A.J. Kirby, *The hydrolysis of aspirin. Intramolecular general base catalysis of ester hydrolysis*. J Am Chem Soc, 1967. **89**(19): p. 4857-63.
118. Ornelas, A., et al., *Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 289-303.
119. Hanby, H.A., et al., *Platelet dense granules begin to selectively accumulate mepacrine during proplatelet formation*. Blood Adv, 2017. **1**(19): p. 1478-1490.
120. Masliah-Planchon, J., L. Darnige, and S. Bellucci, *Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update*. Br J Haematol, 2013. **160**(1): p. 5-11.
121. Cai, H., 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): p. 282-91.
122. Nishimura, J., S. Okamoto, and H. Ibayashi, *Abnormalities of platelet adenine nucleotides in patients with myeloproliferative disorders*. Thromb Haemost, 1979. **41**(4): p. 787-95.
123. Pareti, F.I., et al., *Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders*. Thromb Haemost, 1982. **47**(2): p. 84-9.
124. Leoncini, G., et al., *Platelets of patients affected with essential thrombocythemia are abnormal in plasma membrane and adenine nucleotide content*. Eur J Haematol, 1990. **44**(2): p. 116-20.
125. Gordon, N., et al., *Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry*. Br J Haematol, 1995. **89**(1): p. 117-23.

126. Selle, F., et al., *Clinical and Laboratory Findings in Patients with delta-Storage Pool Disease: A Case Series*. *Semin Thromb Hemost*, 2017. **43**(1): p. 48-58.
127. Jensen, M.K., et al., *Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(1): p. 116-24.
128. Coucelo, M., et al., *JAK2V617F allele burden is associated with thrombotic mechanisms activation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients*. *Int J Hematol*, 2014. **99**(1): p. 32-40.
129. Andres, O., et al., *A novel two-nucleotide deletion in HPS6 affects mepacrine uptake and platelet dense granule secretion in a family with Hermansky-Pudlak syndrome*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017. **64**(5).
130. Bellucci, S., et al., *Defective collagen-induced platelet activation in two patients with malignant haemopathies is related to a defect in the GPVI-coupled signalling pathway*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(1): p. 130-8.
131. Strati, P., et al., *Novel hematological parameters for the evaluation of patients with myeloproliferative neoplasms: the immature platelet and reticulocyte fractions*. *Ann Hematol*, 2017. **96**(5): p. 733-738.
132. Estevez, B., et al., *Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation*. *Blood*, 2016. **127**(5): p. 626-36.
133. Cortelazzo, S., et al., *Spectrum of platelet aggregation abnormalities in myeloproliferative diseases*. *Ric Clin Lab*, 1981. **11**(1): p. 35-42.
134. Budde, U., et al., *Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma*. *Blood*, 1993. **82**(6): p. 1749-57.
135. Budde, U., et al., *Subunit composition of plasma von Willebrand factor in patients with the myeloproliferative syndrome*. *Blood*, 1986. **68**(6): p. 1213-7.
136. Michiels, J.J., et al., *The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera*. *Semin Thromb Hemost*, 2006. **32**(6): p. 589-604.
137. Michiels, J.J., *Acquired von Willebrand disease due to increasing platelet count can readily explain the paradox of thrombosis and bleeding in thrombocythemia*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 1999. **5**(3): p. 147-51.
138. Lancellotti, S., et al., *Qualitative and quantitative modifications of von Willebrand factor in patients with essential thrombocythemia and controlled platelet count*. *J Thromb Haemost*, 2015. **13**(7): p. 1226-37.
139. Griesshammer, M., et al., *Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia*. *Thromb Res*, 1999. **96**(3): p. 191-6.
140. Wehmeier, A., et al., *Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders*. *Thromb Res*, 1991. **61**(3): p. 271-8.
141. Villmow, T., B. Kemkes-Matthes, and A.C. Matzdorff, *Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes*. *Thromb Res*, 2002. **108**(2-3): p. 139-45.
142. Chen, K., Y. Lin, and T.C. Detwiler, *Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets*. *Blood*, 1992. **79**(9): p. 2226-8.
143. Kehrel, B.E. and A.C. Fender, *Greetings from the endoplasmic reticulum (ER): escaping ER thiol isomerases regulate thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2018. **16**(2): p. 364-366.
144. Siewiera, K., et al., *Higher mitochondrial potential and elevated mitochondrial respiration are associated with excessive activation of blood platelets in diabetic rats*. *Life Sci*, 2016. **148**: p. 293-304.

145. Matarrese, P., et al., *Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes toward the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6006-15.
146. Perrotta, P.L., C.L. Perrotta, and E.L. Snyder, *Apoptotic activity in stored human platelets*. Transfusion, 2003. **43**(4): p. 526-35.
147. Gyulkhandanyan, A.V., et al., *Mitochondrial Inner Membrane Depolarization as a Marker of Platelet Apoptosis : Disclosure of Nonapoptotic Membrane Depolarization*. Clin Appl Thromb Hemost, 2017. **23**(2): p. 139-147.
148. Vogel, S., et al., *Elevated mitochondrial membrane potential of circulating monocyte-platelet aggregates in patients with coronary heart disease*. Int J Cardiol, 2015. **181**: p. 135-7.
149. Rand, M.L., et al., *Procoagulant surface exposure and apoptosis in rabbit platelets: association with shortened survival and steady-state senescence*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(4): p. 651-9.
150. Marin Oyarzún, C.P. and P.G. Heller, *Platelets as Mediators of Thromboinflammation in Chronic Myeloproliferative Neoplasms*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1373.
151. Falanga, A., et al., *Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4261-6.
152. Maugeri, N., et al., *Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug?* J Thromb Haemost, 2006. **4**(12): p. 2593-8.
153. Ricksten, A., et al., *Rapid decline of JAK2V617F levels during hydroxyurea treatment in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Haematologica, 2008. **93**(8): p. 1260-1.
154. Campbell, P.J., et al., *Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study*. Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1945-53.
155. Latagliata, R., et al., *Symptomatic mucocutaneous toxicity of hydroxyurea in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: the Mister Hyde face of a safe drug*. Cancer, 2012. **118**(2): p. 404-9.
156. Alvarez-Larran, A., et al., *Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis*. Ann Hematol, 2008. **87**(4): p. 269-76.
157. Liozon, E., et al., *Is treatment with hydroxyurea leukemogenic in patients with essential thrombocythemia? An analysis of three new cases of leukaemic transformation and review of the literature*. Hematol Cell Ther, 1997. **39**(1): p. 11-8.
158. Sterkers, Y., et al., *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion*. Blood, 1998. **91**(2): p. 616-22.
159. Gangat, N., et al., *Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 270-6.

