Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zur *in vivo* proteolytischen Spaltung des von-Willebrand-Faktors bei verschiedenen Erkrankungen

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

Vorgelegt von

Johannes Irle
aus Darmstadt

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Widmung

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Ziel der Dissertation 15

2 Literaturdiskussion 19

2.1 Einleitung 19

2.2 Der Vorgang der Hämostase 19

2.3 Von Willebrand-Faktor 23

2.3.1 Aufbau und Synthese des VWFs 23

2.3.2 Funktion des VWF 24

2.4 ADAMTS13 25

2.4.1 Synthese und molekularer Aufbau der ADAMTS13 25

2.4.2 Funktion der ADAMTS13 26

2.5 Pathophysiologie 28

2.5.1 Von Willebrand-Jürgens-Syndrom (von Willebrand-Syndrom, VWS) 28

2.5.1.1 Klinische Erscheinung 28

2.5.1.2 Einteilung des VWS 28

2.5.1.2.1 Angeborene VWS 28

2.5.1.2.2 Erworbenes VWS 31

2.5.1.3 Diagnostik 32

2.5.1.4 Therapie des VWS 33

2.5.2 Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura 34

2.5.2.1 Klinische Erscheinung der TTP 34

2.5.2.2 Pathophysiologie der TTP 34

2.5.2.3 Einteilung der TTP 35

2.5.2.4 Therapie der TTP 36

3 Material und Methoden 39

3.1 Material 39

3.1.1 Geräte 39

3.1.2 Proteine, Enzyme, chemische Substanzen, Lösungen, Puffer und Antikörper 40

3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Materialien zur Blutentnahme 42

3.1.4 Software 43

3.2 Methoden 43

3.2.1 Anreicherunng des VWF aus humanem Plasma 43

3.2.1.1 Vorbereitung der CNBr-aktivierten Sepharose 4B und Liganden Kopplung 43
3.2.1.2 Adsorption des humanen VWF an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B 46
3.2.1.3 SDS-PAGE 48
3.2.1.4 Western Blot 50
3.2.1.5 Silberfärbung 52
3.2.2 Untersuchung zur Intensität der Absorption des VWFs und seiner proteolytischen Spaltprodukte – Dialyse-System 53
3.2.3 Herstellung von Standards von ungespaltenem und vollständig ADAMTS13-gespaltenem rekombinantem VWF 55
3.2.4 Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin 56
3.2.5 VWF:AG-Bestimmung 56

4 Ergebnisse 57

4.1 Methodenentwicklung zur Anreicherung und Quantifizierung des von-Willebrand-Faktors (VWF) und seiner Spaltprodukte aus humanem Plasma 57

4.1.1 Untersuchung der bestmöglichen Konditionen zur Anreicherung von VWF aus humanem Plasma 57
4.1.1.1 Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelte polyklonale anti-VWF-Antikörper 57
4.1.1.2 Ermittlung der optimalen Kopplungsmenge an Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper an Sepharose-Beads 61
4.1.1.3 Dosisermittlung des zu offerierenden VWF in humanem Plasma an eine definierte Menge mit polyklonalem anti-VWF-Antikörper beladener CNBr-aktivierte Sepharose 4B 63
4.1.1.4 Quantitative Auswertung der Pixeldichte von VWF-Banden im Western Blot 65
4.1.2 Untersuchung zur Intensität der Absorption von VWF-Spaltprodukten bei verstärkter Spaltung des VWF69
4.1.2.1 Proteolytische Spaltung von gereinigtem denaturiertem humanem VWF-Konzentrat mittels ADAMTS13 im Normalplasma im zeitlichen Verlauf 69
4.1.2.2 Quantitative Auswertung der Pixeldichte von mittels plasmatischer ADAMTS13 gespaltenem VWF mit und ohne Adsorption an Sepharose-Beads 70
4.1.2.3 Erste quantitative Messungen der Pixeldichte des VWF 73
4.1.2.4 Quantitative Auswertung der Pixeldichte einer Verdünnungsreihe von gereinigtem humanem VWF-Konzentrat Willfact® im Western Blot 75
4.1.2.5 Quantitative Auswertung der Pixeldichte einer Verdünnungsreihe von rekombinantem VWF im Western Blot 79
4.1.2.6 Versuch der vollständigen Spaltung von rekombinantem VWF mit plasmatischer ADAMTS13 81
4.1.2.7 Versuch der Spaltung von rekombinantem VWF mittels rekombinanter ADAMTS13 82

4.1.2.8 Vollständige Spaltung von rekombinantem VWF mittels rekombinanter ADAMTS13 84
4.1.2.9 Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf 88
4.1.2.10 Konzentrationsermittlung von adsorbiertem plasmatischem VWF-Monomer und seiner 176 kDa- unnd 140 kDa-Spaltprodukte im Probandenplasma mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF 93
4.1.3 Verwendung diverser primärer Antikörper zum Nachweis des VWF und seiner Fragmente induziert mittels rhADAMTS13 und Plasmin im Western Blot.....95
4.1.3.1 Darstellung des 140 kDa-N-terminalen Fragments des rekombinanten VWF mittels anti-A2-VWF-Antikörper 95
4.1.3.2 Untersuchung des VWF unnd seiner Fragmente nach Adsorption an CNBr-aktivierte Sepharose 4B anhand der Antikörper M7 und M31 97
4.1.4 Untersuchung der Spaltung des VWF durch Plasmin 98
4.1.4.1 Proteolytische Spaltung von rekombinantem und humanem VWF durch Plasmin über die Zeit 98
4.1.4.2 Gegenüberstellung der unterschiedlichen Spaltfragmente des von Plasmin und von ADAMTS13 gespaltenen VWF 100
4.1.4.3 Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin, analysiert in einem 10% Polyacrylamid-Gel 101
4.1.4.4 Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf..102
4.2 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen 107
4.2.1 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit erworbenem von-Willebrand-Syndrom (VWS) und erworbener thrombotisch thrombozytopenischer Purpura (TTP) im akuten Schub sowie in Remission 107
4.2.2 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei hereditärer TTP in Remission 110
4.2.3 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS.....112
5 Diskussion 118
5.1 Methodendiskussion 118
5.1.1 Anreicherung des VWF an CNBr-aktivierte Sepharose Beads aus humanem Plasma 118
5.1.2 Densitometrische Auswertung der VWF Signale auf Western Blots 120
5.1.3 Adsorption von proteolytisch gespaltenem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose Beads 122
5.1.4 Notwendigkeit von VWF-Proteinstandards 123
5.2 Charakterisierung verschiedener Fragmente des VWFs mit monoklonalen Antikörpern 126

5.3 Zu den Untersuchungen des VWF und seiner *in vivo* Spaltprodukte bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen 131

5.3.1 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei Patienten mit hereditärem oder erworbenem VWS 131

5.3.2 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei Patienten mit iTTP im akuten Schub und in Remission 134

5.3.3 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei einer Patientin mit hereditärer TTP in Remission . 136

5.3.4 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit Plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS 137

5.3.4.1 Ergebnisse von Patient 1 138

5.3.4.2 Ergebnisse von Patient 5 139

5.3.4.3 Ergebnisse von Patient 6 141

6 Ausblick 142

7 Zusammenfassung 144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des maturen VWF, adaptiert nach Ruggeri 2001 [42] *24*
Abbildung 2: Schematische Darstellung der ADAMTS13 nach Zander et al. [52] *26*
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mutationsbereiche des VWFs, nach Budde 2004 [37] *29*
Abbildung 4: Darstellung der Pathophysiologie der TTP nach Ärzteblatt, Bommer et all [79]; a) normaler Blutfluss b) Zirkulationsstörung, Mikrothromben- und Fragmentozyten nach Endothelzellschaden bei thrombotischer Mikroangiopathie *35*
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kopplung der CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit einem polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörpern *46*
Abbildung 6: DTT in Reaktion mit Proteinen *47*
Abbildung 7: Reduzierte Proteine mit DTT in Reaktion mit IAA *47*
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Elektrophoresekammer *49*
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Western Blot Kammer *51*
Abbildung 10: Aufbau des Dialyse-Systems *55*
Abbildung 11: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Silberfärbung, 5% Polyacrylamidgel, Silberfärbung; ganz links Markerbande (MG) *59*
Abbildung 12: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Detektion mit primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper und niedriger Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit Spur 1 bis 4:10s., Expositionszeit Spur 5 bis 8: 60 Sekunden (s). *60*
Abbildung 13: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Detektion mit primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper und hoher Expositionszeit 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 80 min *60*
Abbildung 14: Dosisermittlung der auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit aufsteigender Konzentration von RaVWFab, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x8 min *62*
Abbildung 15: Dosisermittlung des auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit 1000µl 1:4 verdünntem Plasma, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5s *63*
Abbildung 16: Dosisermittlung des auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit 500µl 1:6 verdünntem Plasma, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5s *64*
Abbildung 17: Western Blot Proband A, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,0 s *65*
Abbildung 18: Quantitative Erfassung der Pixeldichte von VWF-Banden im Western Blot (Proband A) *65*
Abbildung 19: Western Blot Proband B, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 6,6 s *66*

Abbildung 20: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B als Säulendiagramm 66
Abbildung 21: Western Blot Proband C, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5,5s. 67
Abbildung 22: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C als Säulendiagramm 67
Abbildung 23: Abbildung 24: Errechneter adsorbierter VWF aus den Adsorptionsüberstanden an jeweils 30µl CNBr aktivierte Sepharose Beads 4B aus den Adsorptionsüberständen der Probanden A, B und C..... 68
Abbildung 24: Proteolytische Spaltung von Willfact mittels ADAMTS13 aus Normalplasma im zeitlichen Verlauf, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s. 70
Abbildung 25: VWF gespalten mit plasmatischer ADAMTS13 während der Dialyse gegen 1, 5M Urea, 0,0 5M Tris bei pPH 8,0 von Proband C – A1-A5 mit Adsorption, B1-B5 ohne Adsorption, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s. 71
Abbildung 26: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband A der A-Proben 71
Abbildung 27: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband A der B-Proben..... 71
Abbildung 28: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B der A-Proben..... 72
Abbildung 29: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B der B-Proben..... 72
Abbildung 30: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C der A-Proben..... 72
Abbildung 31: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C der B-Proben..... 73
Abbildung 32: Quantivative Erfassung der Pixeldichte mit 1µg Willfact® pro Spur, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s. n=4 (technische Replikate)..... 74
Abbildung 33: Auswertung der quantitativen Erfassung der Pixeldichte Spur 1-4 mit jeweils 1µg Willfact® 74
Abbildung 34: Verdünnungsreihe von gereinigtem humanem VWF-Konzentrat Willfact® im Western Blot, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,1s. 75
Abbildung 35: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe A Willfact®..... 76
Abbildung 36: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe B Willfact®..... 76
Abbildung 37: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe C Willfact®..... 76
Abbildung 38: Versuch der vollständigen Spaltung von Willfact® mittels plasmatischer ADAMTS13 im Dialysesystem (siehe 3.2.2), 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,5s. 78
Abbildung 39: Verdünnungsreihe von rekombinaten VWF im Western Blot, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,1s. 79
Abbildung 40: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe A, rekombinanter VWF..... 80
Abbildung 41: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe B, rekombinanter VWF..... 80
Abbildung 42: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe C, rekombinanter VWF..... 80
Abbildung 43: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 2,1s. 82
Abbildung 44: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 bei 300 rpm, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,3s. 83

Abbildung 45: Nahezu Vollständige Spaltung von rhVWF mit trunkierter rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 9,1s.....86
Abbildung 46: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe A 86
Abbildung 47: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe B.....87
Abbildung 48: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe C.....87
Abbildung 49: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf – Abnahme des VWF-Monomers und parallele Zunahme der 176kD und 140kD-Fragmente – BLOT A, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 8,7s..... ***Fehler! Textmarke nicht definiert.***
Abbildung 50: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-4 aus Abbildung 50 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT A 89
Abbildung 51: Auswertung der Pixeldichte Spuren 6-9 aus Abbildung 50 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT A 89
Abbildung 52: Abnahme des rhVWF 250 kDa Monomers aus Abbildung 50 Spur 6-9 – BLOT A im Säulendiagram 90
Abbildung 53: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf für das VWF-Monomer und für das rhVWF Spaltprodukt – BLOT B, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 12s.....91
Abbildung 54: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-4 aus Abbildung 54 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT B 91
Abbildung 55: Auswertung der Pixeldichte Spuren 6-9 aus Abbildung 54 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT B 92
Abbildung 56: Zunahme der rhVWF-Spaltprodukte aus Abbildung 54 Spur 6-9 – BLOT B im Säulendiagram 92
Abbildung 57: Konzentrationsermittlung von adsorbiertem plasmatischem VWF mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,2s 93
Abbildung 58: Eichkurve für das 250 kDa Monomer (Standards 1-3) von Abbildung 58.....94
Abbildung 59: Eichkurve für die rhVWF Spaltprodukte (Standards 4-6) von Abbildung 58.....94
Abbildung 60: Darstellung des 140 kDa-Fragments in rekombinantem VWF mittels anti-A2-VWF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5s. 96
Abbildung 61: Fragmente des VWF nach Adsorption an Sepharose-Beads anhand der Antikörper M7 und M31, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5,5s.....98
Abbildung 62: Proteolytische Spaltung von rekombinantem und humanem VWF durch Plasmin über die Zeit, 5% Polyacrylamidgel, Detektion mit HRP-markiertem Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,3s. 99

Abbildung 63: Mischung der proteolytischen Spaltung des rhVWF durch Plasmin und der proteolytischen Spaltung durch ADAMTS13, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 0,8s. 100

Abbildung 64: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin in einem 10% Polyacrylamid-Gel, Expositionszeit 4,5s. 102

Abbildung 65: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primären anti-VWF-AK, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3,3s. 103

Abbildung 66: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem M7-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK Antikörper, Expositionszeit 2 104

Abbildung 67: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem M31-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, Expositionszeit 6,6s. 104

Abbildung 68: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem anti-VWF-A2-AK, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, Expositionszeit 30s. 105

Abbildung 69: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 1/3) 105

Abbildung 70: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 2/3) 105

Abbildung 71: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 3/3) 106

Abbildung 72: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit erworbenem von-Willebrand-Syndrom und erworbener thrombotisch thrombozytopener Purpura im akuten Schub sowie in Remission, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper. 108

Abbildung 73: Absorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 10s. 109

Abbildung 74: Patient mit hereditärer TTP in Remission mit niedriger Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-VWF-Antikörper, Expositionszeit 1,2s. 111

Abbildung 75: Patient mit hereditäre TTP in Remission mit hoher Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3,4s. 111

Abbildung 76: Untersuchug des VWF und seiner Spaltprodukte Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primären anti-VWF-AK, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 6s. 113

Abbildung 77: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem anti-VWF-A2-AK, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Exposition 50s.....113
Abbildung 78: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M7-Antikörper, Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 10s 114
Abbildung 79: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M31-Antikörper, Primärantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 1s 114
Abbildung 80. Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primären anti-VWF-AK, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s 115
Abbildung 81: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M7-Antikörper, Primärantikörper M7 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s 116
Abbildung 82: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M31-Antikörper, Primärantikörper M31 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s 116
Abbildung 83: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem anti-VWF-A2-AK, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 300s. 117
Abbildung 84: Schematische Darstelung der monoklonale Antikörper, Epitopkarte nach Berkowitz et al.l [92], die zwischen Plasmin- und nativ gespaltenem VWF differenziert.....127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv, BZ = Blutungszeit *31*
Tabelle 2: Materialauflistung - Geräte *39*
Tabelle 3: Materialauflistung Proteine und Enzyme *40*
Tabelle 4: Materialauflistung Chemische Substanzen *40*
Tabelle 5: Lösungen und Puffer *41*
Tabelle 6: Antikörper *42*
Tabelle 7: Materialauflistung Blutentnahme *42*
Tabelle 8: Materialauflistung Verbrauchsmaterialien *42*
Tabelle 9: Software *43*
Tabelle 10: Konzentration und Menge von RaVWFabzu Abbildung 12, 13 und 14 ..... *59*
Tabelle 11: Konzentration und Menge von RaVWFab zu Abbildung 14 ..... *62*
Tabelle 12: Bestimmung des VWF-Gehaltes aus den Überstanden nach Adsorption des VWF an die Sepharose-Beads zu Abbildung 14 ..... *62*
Tabelle 13: Ergebnisse des VWF-Gehaltes aus den Überstanden von Abbildung 15 und 16 und der errechneten Adsorption des VWF in µg *64*
Tabelle 14: Ergebnisse des VWF-Gehaltes aus den Überstanden von den Probanden A, B und C und der errechneten Adsorption des VWF in µg *68*
Tabelle 15: Konditionen der proteolytischen VWF-Spaltung von Abbildung 25 ..... *70*
Tabelle 16: Daten der ersten quantitativen Messungen der Pixeldichte des VWF aus Abbildung 34 ..... *74*
Tabelle 17: VWF-Spaltung (Willfact®) durch ADAMTS13 im Normalplasma im Dialysesystem (siehe 3.2.2) *77*
Tabelle 18: Ansatz zur vollständigen Spaltung von Willfact® *77*
Tabelle 19: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen (Ansatz im Dialyse-System) *81*
Tabelle 20: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen (Ansatz im Western Blot) *81*
Tabelle 21: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 bei 300 rpm *83*
Tabelle 22: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Pufferansätze *85*
Tabelle 23: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Pipettieransatz *85*
Tabelle 24: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Ansatz für Western Blot *85*
Tabelle 25: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf, BLOT A *88*
Tabelle 26: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf für das VWF-Monomer und für das rhVWF Spaltprodukt, BLOT B *90*

Tabelle 27: Konzentrationsermittlung von absorbiertem plasmatischem VWF mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF *93*
Tabelle 28: Berechnung des VWF-Monomers und der 176kDa- und 140kDa-Fragmente anhand der Eichkurven aus Abbildung 58 ..... *94*
Tabelle 29: Probenzusammensetzung Abbildung 61 ..... *96*
Tabelle 30: Probenzusammensetzung Abbildung 61 ..... *97*
Tabelle 31: Ansatz proteolytische Spaltung des rhVWF durch Plasmin *99*
Tabelle 32: Ansatz Mischung der proteolytische Spaltung des rhVWF durch Plasmin und der proteolytischen Spaltung durch ADAMTS13 ..... *100*
Tabelle 33: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin in einem 10% Polyacrylamid-Gel *101*
Tabelle 34: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf *103*
Tabelle 35: Adsorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen aus Abbildung 72 ..... *108*
Tabelle 36: Adsorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen aus Abbildung 73 ..... *109*
Tabelle 37: Hereditäre TTP in Remission Abbildung 75 und 76 ..... *110*
Tabelle 38: Plasmazelldyskresie-assoziierte erworbene VWS aus Abbildungen 76-79 ..... *112*
Tabelle 39: Auszug aus Dicke et al., Ergebnisse und Daten über die einzelnen beschriebenen Patienten [78] ... *138*
Tabelle 40: Plasmazelldyskresie-, Fibrinolyse- und VWS-assoziierte Parameter über die Zeit von Patient 5 nach Dicke et al. [78] *140*

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
anti-VWF-A2-AK	anti-VWF-A2-Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aVWS	erworbenes/ “acquired“ von-Willebrand-Syndrom/-Disease“
ATP	Adenosintriphosphat
$BaCl_2$	Bariumchlorid
BSA-Lösung	Bovines Serum Albumin
CK	Cystein-Knoten
Cys	Cystein-reiche Domäne
CTX	Chemotherapie
Da	Dalton
Dis	Disintegrin ähnliche Domäne
DTT-Lösung	Dithiothreitol
FVIII:C	Faktor VIII-Gerinnungsaktivität
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
HRP	„Horseradish peroxidase“
IAA-Lösung	Iodacetamid
iTTP	autoimmunvermittelte Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
kDA	Kilodalton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	millimolar
M	Mol
MP	Metalloproteasedomäne
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaN_3	Natriumazid
NETs	„Neutrophil extracellular traps“
NHP	„Normal human plasma“
nn	nomen nominandum, „(noch) zu nennender Name“
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAP	Plasmin-α2-Antiplasmin-Komplexe
PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation
PPP	Platelet-poor plasma „Plättchen armes Plasma”
RaVWFab	Polyklonaler “Kaninchen” anti-human von-Willebrand-Faktor Antikörper
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
rhADAMTS13	rekombinante humane ADAMTS13
rhVWF	rekombinanter von-Willebrand-Faktor
rpm	“revolutions per minute”
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunden
CNBr-aktivierte	Cyanogen Bromid aktivierte Sepharose® 4B
	Sepharose 4B
TBS-Puffer	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethan-Chlorwasserstoffsäure
t-PA	tissue-type Plasminogen Activator
TTP	Thrombotisch thrombozytopenische Purupra
U	Unit
ULVWF	Ultra-large-von-Willebrand-Faktor

uPA	Urokinase
USS	Upshaw-Schulman-Syndrom
V	Volt
VWF:Ac	von-Willebrand-Faktor GpIb-Bindungsaktivität
VWF:AG	von-Willebrand-Faktor Antigen
VWF:CB	von-Willebrand-Faktor Kollagenbindungsaktivität
VWF:RCo	von-Willebrand-Faktor Ristocetin-Kofaktor-Aktivität
VWF	von-Willebrand-Faktor
VWS	von-Willebrand-Jürgens-Syndrom/-„Disease“
xg (RCF)	“times gravity” (“Relative Centrifugal Force”)/ relative Zentrifugalbeschleunigung

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Im Jahr 1857 schrieb der britische Naturforscher Charles Darwin an seinen wissenschaftlichen Kollegen Alfred Russel Wallace in einem seiner Briefe: „Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“ (englische Orginalversion: „I am a firm believer, that without speculation there is no good & original observation.") [1]. Wie ähnlich muss es dem amerikanischen Arzt Eli Moschcovitz 1924 gegangen sein, als er ein sechszehnjähriges Mädchen untersuchte, das an einer plötzlichen muskulären Schwäche, Fieber und petechialen Blutungen litt, sowie Zeichen einer Hämolyse im Blut aufzeigte [2]. Der Krankheitsverlauf des Mädchens verschlechterte sich zunehmend und sie starb bereits zwei Wochen nach Auftreten der ersten Symptome. Eli Moschcovitz schrieb, dass es Dr. E. Libman war, der die These aufstellte, dass es sich hierbei um eine neue Krankheit handeln müsse. Eine Autopsie des verstorbenen Mädchens wurde durchgeführt, bei der eine Vielzahl von hyalinen Thromben auffiel, die sich in den kleinen Arteriolen und Kapillaren gebildet hatten. Ausgehend von den damaligen Kenntnissen nahm Moschcovitz an, dass es sich bei seinen Beobachtungen um eine Art Vergiftung handeln müsse, welche die Kraft besaß, sowohl das Blut zum Agglutinieren zu bringen als auch eine Hämolyse hervorzurufen. 1947 beschrieb Dr. Karl Singer einen ähnlichen Fall, bei dem es sich um ein elfjähriges Mädchen handelte, welches an Schwäche, Fieber sowie Hämorrhagien litt und bereits nach einer Woche verstarb [3]. Singer gab dem Symptomkomplex, unter dem die Patientin litt, den Namen Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura (TTP). Dieser Symptomkomplex bestand aus klinischen Blutungserscheinunungen, laborchemisch nachgewiesener Anämie und Thrombozytopenie, neurologischen Symptomen und Fieber.

1966 beschrieben Amorosi und Ultmann et al. die Symptome der TTP aus insgesamt 271 Fällen. Die Symptome und Befunde, die in den meisten Fällen gefunden wurden, waren die hämolytische Anämie, eine Thrombozytopenie, neurologische Erscheinungen, Fieber und Nierenversagen [4]. In den Blutausstrichen der TTP-Patienten fiel vor allem eine bizarre Anordnung und Fragmentierung der Erythrozyten auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde aber immer noch über die Ursache der TTP gemutmaßt. 1982 stellten Moake et al. im *New England Journal of Medicine* die

Hypothese auf, dass extrem adhäsive Multimere eines Ultra-lange-von-Willebrand-Faktors (ULVWF) die Thrombozyten verklumpten [5].
1996 fanden Furlan et al. und Tsai et al. zum gleichen Zeitpunkt unabhängig eine spezifische Protease, welche den von Willebrand-Faktor (VWF) im humanen Plasma spaltet [6] [7]. Schon früher wurde berichtet, dass sich ein ULVWF bei TTP-Patienten im Plasma findet [5], aber erst 1997 konnte die Verbindung zwischen den ULVWF und einer verminderten ADAMTS13-Aktivität erbracht werden [8]. Zheng et al. fanden schließlich 2001 heraus, dass es sich bei der Protease, welche den VWF schneidet, um eine Metalloprotease der ADAMTS-Familie handelt und nannte sie „a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13“ (ADAMTS13) [9]. Somit konnten nach mehreren Jahrzehnten Forschung, ausgehend von einer Spekulation, neue Beobachtungen gemacht werden. Das Resultat war nicht nur das Wissen und das Verständnis über die Krankheit, sondern auch die Möglichkeit, aus den im Laufe der Zeit gewonnenen Erkenntnissen eine gezielte Diagnostik und Therapie für die TTP zu entwickeln. Levy et al. fanden durch ihre „Genome wide association studies“ einen Defekt des gleichen Gens, nämlich der ADAMTS13, bei einigen Familien mit hereditärer TTP [10]. Neben der seltenen hereditären TTP gibt es die ebenfalls seltene, aber doch häufigere, erworbene TTP, welche durch Autoantikörper gegen die ADAMTS13 gekennzeichnet ist [11].
Heute stehen uns Mittel zur Verfügung, die dabei helfen, die TTP zu diagnostizieren und therapieren. Zur Diagnostik soll eine quantitative Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität durchgeführt werden, um eine TTP von anderen Formen der thrombotischen Mikroangiopathien abzugrenzen [12]. Bereits bei der Verdachtsdiagnose einer TTP muss wegen der hohen Mortalität eine Plasmapherese-Therapie mit Ersatz des ausgetauschten Plasmas durch frisch gefrorenes Spenderplasma initiiert werden [13]. Nicht zuletzt wurde auch der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Rituximab getestet [14]. Die Diagnose einer TTP wird bestätigt, wenn der ADAMTS13-Spiegel kleiner als 10% ist [15].
Die herkömmliche Darstellung und der Nachweis der von-Willebrand-Faktor-Multimere erfolgt mittels Multimeranalyse. Dieser Test wird hauptsächlich zur Klassifizierung eines von-Willebrand-Jürgens-Syndrom/- „Disease“ (VWS) oder zum Nachweis von ULVWF bei Patienten mit TTP oder hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) verwendet. Die Multimeranalyse ist ein qualitativer Test, in welchen die Gesamtgrößenverteilung von VWF-Multimeren sowie das Bandenmuster beschrieben

wird. Dabei erscheinen die Multimere üblicherweise bei Verwendung eines Agarosegels mit mittlerer Agarosekonzentration (1,2 - 1,8%) als Triplett-Struktur oder können als Quintuplett-Struktur auf einem hochauflösenden Gel (>2%) dargestellt werden. Die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglichte die Analyse des VWFs ohne vorherige Reduktion (Denaturierung) [16].
In der Multimeranalyse ist es aufgrund der geringen Auflösung nicht möglich, genauere Aussagen über die Splatstelle des VWFs zu machen. Daher wählten wir für unsere Arbeiten einen neuen Ansatz. Wir wollten gezielt Informationen über die Spaltstelle, die Spaltprodukte und deren Verteilung im Gel erfahren. Im Gegensatz zu dem herkömmlichen, nichtreduzierten Agarosegel verwendeten wir bei unseren Untersuchungen ein reduziertes Gel. Der VWF wurde dabei vollständig durch Lösen der Disulfidbrücken zwischen seinen Untereinheiten denaturiert. Am Ende der Analyse sollte lediglich das VWF-Monomer bei 250 Kilodalton (kDA) sowie die Spaltprodukte des Monomers bei 140 kDa und 176 kDa vorliegen.

Zielsetzung der Arbeit

Das erste Ziel war eine Methodenetablierung zur Analyse der *in vivo* generierten VWF-Spaltprodukte in einem reduzierten Gel. Zur Anreicherung soll der VWF in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren aus dem Plasma immunadsorbiert und dann mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und eines anschließenden Immunoblottings untersucht werden. Dabei sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, den VWF direkt aus dem menschlichen Plasma zu absorbieren und gleichzeitig das VWF-Monomer sowie dessen Spaltprodukte im Western Blot darzustellen.
Das zweite Ziel war eine Quantifizierung der VWF-Spaltprodukte im Gel, damit wir nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Aussage über das VWF-Monomer und seine Spaltprodukte machen können. Ein Standardpräparat für die densitometrische Auswertung sollte mittels rekombinanten VWF und rekombinanter ADAMTS13 hergestellt werden.
Das dritte Ziel war die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern und Enzymen, um die VWF-Spaltprodukte weiter zu untersuchen und zu detektieren. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf die Spaltung des VWFs mit Plasmin gelegt werden.

Bisherige Untersuchungen haben andeuten lassen, dass Plasmin möglicherweise ebefalls Einfluss auf den VWF bei TTP-Patienten haben kann [17].

Das vierte Ziel war die Untersuchung von Patientenplasmen mit der zuvor neu etablierten Methode. Rekombinanter VWF und gesunde Kontrollspender dienen dabei zur Kontrolle der Ergebnisse. Wir wollten insbesondere der Frage nachgehen, ob Patienten mit einer TTP in Remission VWF-Spaltprodukte aufzeigen und wie sich das Muster der VWF-Spaltprodukte bei einem akuten Schub verhält. Darüber hinaus wollten wir der Frage nachgehen, ob es auch noch andere Enzyme gibt, welche den VWF spalten können und ob es eine Abweichung im Bandenmuster gibt. Als letztes wollten wir auch noch andere hämatologische Erkrankungen untersuchen, die im Zusammenhang mit einem VWS standen. Dabei sollte auch hier der Frage nachgegangen werden, ob sich mit Hilfe von unserer Methode Unterschiede in der Anordnung der Spaltprodukte im Vergleich zu Gesunden finden lassen. Wir untersuchten dazu Patienten mit einem VWS und einem erworbenen/ “acquired“ von-Willebrand-Syndrom/-Disease“ (aVWS).

2 Literaturdiskussion

2.1 Einleitung

Gerinnungsstörungen und die Folgen in Form von Thrombosen oder Blutungen sind den Menschen schon lange bekannt. Bereits während des Mittelalters im Jahr 1271 verfasste Raoul den ersten, gut dokumentierten Fall einer tiefen Beinvenenthrombose [18]. Rudolf Virchow (1822 bis 1902) postulierte, dass der Grund für eine Thrombose, ein Gefäßwandschaden, eine Blutströmungsverlangsamung oder eine Änderung der Blutzusammensetzung sei [19]. In seinen Vorlesungen beschreibt Virchow schon zuvor die Thrombose als den Ort und die Stelle, an dem das Blut gerinnt [20]. Diese Virschow'sche Trias hat bis heute ihre Gültigkeit, insbesondere bei der tiefen Beinvenenthrombose, nicht verloren [21]. Der Münchner Hämatologe Rudolf Marx erfand in seiner Habilitationsschrift den Begriff „Hämostasiologie", unter welchem Marx „die Lehre vom Stehen und Steckenbleiben des Blutes" verstand [22]. Die Hämostase umfasst dabei das Zusammenspiel zwischen Gerinnung und Fibrinolyse, wobei man die plasmatische Gerinnung und Thrombozytenadhäsion/-aggregation zusammen als Hämostasevorgang bezeichnet. An dem Prozess der Blutstillung sind die Gefäßwand, die Thrombozyten und die im Plasma sowie in der interstitiellen Flüssigkeit vorkommenden Stoffe beteiligt, die entweder gerinnungsfördernde oder gerinnungshemmende Eigenschaften besitzen [23].

2.2 Der Vorgang der Hämostase

Der Vorgang der Hämostase kann durch eine Gefäßwandverletzung oder durch eine Fehlregulation des Hämostasesystems ausgelöst werden. Dabei umfasst die Hämostase das funktionelle Zusammenspiel zwischen der Gerinnung des Blutes sowie der Fibrinolyse. An dem Vorgang der Hämostase sind sowohl die vaskulären Komponenten beteiligt als auch die zellulären und humoralen Komponenten des Blutes. Die vaskulären Komponenten beinhalten die Endothelzellen und die subendotheliale Matrix, während von zellulären Komponenten des Blutes vor allem die Thrombozyten an der Blutstillung beteiligt sind. Neben den zellulären Komponenten des Blutes sind auch die humoralen Bestandteile in Form der Gerinnungsfaktoren sowie des fibrinolytischen Systems beteiligt. Beim Vorgang der Hämostase kommt es

zum gleichzeitigen Zusammenspiel von mehreren Mechanismen, die mehr als ein in sich komplexes System gesehen werden müssen, als einzeln und nacheinander ablaufende Prozesse. Viele der im Folgenden beschriebenen Prozesse finden parallel statt [24]. Der Begriff der primären Blutstillung beschreibt zunächst die Vasokonstriktion und die Bildung eines Thrombozytenpfropfes. Die Sekundäre Blutstillung beinhaltet die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskarde, die sowohl auf einen intrinsischen Weg über Kontaktaktivierung als auch über einen extrinsischen Weg durch Gewebsthromboplastin zur Generierung von Thrombin führt, welches Fibrinogen in Fibrin umwandelt und so für die Stabilisierung des Thrombus sorgt [21].

Die Thrombusbildung ist ein dynamischer Prozess, dessen Abfolge der Thrombozytenfunktion in eine Initialphase, eine Extensionsphase und in eine Stabilisierungsphase eingeteilt werden kann [24]. Bei einer Gefäßwandverletzung kommt es zur Freilegung von subendothelialen Strukturen und es erfolgt die Adhäsion von Thrombozyten an diese. Der Schritt der Thrombozytenadhäsion kann als erster Schritt der Hämostase angesehen werden. In dieser Initialphase erfolgt die Bindung der Thrombozyten sowohl an die subendotheliale Matrix über den VWF, als auch durch direkte Interaktion von Thrombozytenrezeptoren, über die thrombozytären Glycoproteine Ia/IIa mit dem subendothelialen Kollagen [25]. Der VWF fungiert dabei als Bindeglied, da er sowohl mit seiner A3-Domäne an das subendotheliale Kollagen bindet als auch an den thrombozytären GPIb-IX-V-Komplex mit seiner A1-Domäne [26, 27]. Durch die Bindung der Thrombozyten an den VWF kommt es schließlich zur Aktivierung der Thrombozyten. Die Aktivierung der Thrombozyten bewirkt eine Veränderung der äußeren Form [28]. Die Thrombozyten wandeln sich von einer ursprünglich eher scheibenartigen Form zu einer kugeligen Form. Dies bewirkt, dass zum einen die Adhäsionsfläche vergrößert wird und zum anderen weitere Thrombozyten aktiviert werden [29]. Durch die Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus dem endoplasmatischen dichten tululären System in das Zytosol der Thrombozyten kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A2. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die Generierung von Thromboxan A2, das für die parakrine Aktivierung von Thrombozyten und die Aggregation benötigt wird. Die Phospholipase A2 spaltet Arachidonsäure aus Membranphospholipiden, welche dann über weitere Zwischenstufen zu Thromboxan A2 oder Prostacyclin umgewandelt werden [30]. Gleichzeitig werden aggregationsfördernde Substanzen wie Adenosindiphosphat

(ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Serotonin aus den dense granula (δ–Granula) freigesetzt [25, 30, 31] sowie aus den α-Granula, neben diversen Proteinen wie unter anderem Faktor V und Fibrinogen, auch der VWF. Das freigesetzte ADP bindet an den $P2Y_1$- und $P2Y_{12}$-Rezeptor und bewirkt dadurch ein positives Feedback, was zu einer Verstärkung der Aktivierung führt [31]. Thromboxan A2 bindet an seinen Rezeptor und verstärkt die Aktivierung und induziert die Aggregation [32]. In der Extensionsphase kommt es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten, nach dem sich eine Thrombozytenschicht an der Verletzungsstelle gebildet hat. Dies ist durch die Ausschüttung von ADP, Thromboxan A2 und Thrombin möglich, das ebenfalls an der Verletzungsstelle generiert wird. Thrombin ist selbst auch ein starker Thrombozytenaktivator. In der anschließenden Phase kommt es zur Stabilisierung des Thrombus. Fibrinogen bindet an die aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren von benachbarten Thrombozyten und sorgt somit für Vernetzung und Aggregation der Thrombozyten untereinander. Nach der Bindung von Fibrinogen kommt es zu Signalen, die eine Reorganisation des Zytoskeletts und somit die Bildung und Stabilisierung eines Plättchenaggregats ermöglichen. Die Fibrinbildung durch Thrombin, das als Folge der plasmatischen Gerinnung entsteht, führt dann zu einer Stabilisierung des primären Thrombozytenpfropfs. Fibrin, welches zuerst noch löslich ist, wird durch FXIIIa quervernetzt und somit in ein unlösliches, stabiles Fibrin umgewandelt [24, 33].

Die Endothelzellen der Gefäße bilden Substanzen, die den Gefäßtonus beeinflussen können. Sie produzieren unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), was einen vasodilatierenden Effekt hat, als auch einen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation. Die Freisetzung von NO erfolgt durch die vorangegangene Stimulation der Endothelzelle durch Bradykinin, Histamin oder Vasopression. Serotonin und Noradrenalin, die aus aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet werden, bewirken eine Vasokonstriktion. Neben NO bildet die Endothelzelle auch Prostacyclin, was einen ähnlichen Effekt wie NO auf den Gefäßtonus hat, sowie Endothelin-1 und Angiotensin-converting enzyme (ACE). Endothelin-1 und Thromboxan A2 bewirken beide eine direkte Vasokonstriktion, während ACE indirekt über die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II vasokonstriktorisch wirkt [34, 35]. Eine Stimulation der Endothelzelle bewirkt ebenfalls die Freisetzung von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF), der auch eine Thrombozytenadhäsion und Aggregation bewirkt, sowie eine Freisetzung von VWF, der in den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen und in den

Thrombozyten gespeichert wird [36]. Endothelzellen sezernieren daneben noch Stoffe wie Nukleotidasen. Nukleotidasen spalten ATP über ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin. ADP selbst ist ein sehr starker Förderer der Thrombozytenaggregation, während Adenosin die Thrombozytenaktivierung mindert. Die Endothelzelle trägt somit zur lokalen Regulation der Thrombozytenaggregation bei [37].

Das plasmatische Gerinnungsystem dient zur Fixierung des primären Thrombus durch Fibrin. Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine, deren Aktivierung in Form einer Kaskade abläuft und an deren Ende die Bildung von Thrombin aus Prothrombin steht [38]. Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems kann über einen extrinischen Weg über den „tissue factor“ ausgelöst werden, als auch über einen intrinsischen Weg führen, der über eine Kontaktaktivierung der Faktoren FXII und FXI erfolgt. Thrombin sorgt für die Umwandlung von Fibrinogen in lösliches Fibrin, das anschließend durch den FXIIIa in ein stabiles Fibrin durch Quervernetzung überführt wird. Durch Bildung eines Fibrinnetzes kommt es zum Einschluss von Erythrozyten und zur Bildung eines festen Thrombus. Neben den prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren gibt es noch eine Reihe von Inhibitoren des Gerinnungssystems, wie z.B. das Antithrombin, das auch vor einer überschießenden Thrombusbildung schützt.

Die Fibrinolyse limitiert die Gerinnselbildung und sorgt für die Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes. Sie kann genau wie das plasmatische Gerinnungssystem auch über eine intrinsische Kontaktaktivierung, als auch über einen extrinischen Weg erfolgen, der zur Aktivierung von Plasmin aus Plasminogen führt. Endothelzellen produzieren tissue-type Plasminogen Activator (t-PA), welchen sie bei Hypoxie bzw. nach neurohumoraler Stimulation vermehrt freisetzen. Das t-PA bewirkt die direkte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Neben Plasmin ist „urokinase plasminogen activator“ ein weiterer wichtiger Aktivator des Fibrinolysesystems in dem er wie t-PA auch Plasminogen aktiviert. Plasmin ist in der Lage Fibrin zu den Fibrinspaltprodukten zu spalten und somit für die Auflösung des Thrombus zu sorgen. Die Fibrinolyse selbst wird durch mehrere Inhibitoren wiederum gehemmt. Plasmin kann schnell durch α2-Antiplasmin inhibiert werden, in dem sich Plasmin-α2-Anti-Plasmin-Komplexe bilden (PAP) [21, 24].

Durch ein Ungleichgewicht im Hämostasesystem kommt es schließlich zur Ausbildung von hämorrhagischen Diathesen, die sich klinisch in Form von Blutungsneigungen zeigen, oder zu Thrombophilien, die sich klinisch meist als Thrombosen präsentieren.

2.3 Von Willebrand-Faktor

Der VWF ist ein multimeres Glykoprotein, dass aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Er kommt sowohl im Blutplasma als freier VWF als auch in gespeicherter Form in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und in den alpha-Granula der Thrombozyten vor [39-41]. Der VWF wurde 1926 von dem finnischen Arzt Erik von Willebrand beschrieben. Er untersuchte eine große Familie, die in Åland, an der finnischen Küste, an einer hämorrhagischen Erkrankung litt, welche ursächlich für den Tod mehrer Kinder der Familie war [42-44]. Der VWF wird für die normale Hämostase benötigt, da er die Thrombozytenadhäsion und -aggregation bei der Blutstillung vermittelt. Daneben ist der VWF noch ein Trägermolekül für den Faktor VIII und schützt ihn vor dem vorzeitigen Abbau. Der Faktor VIII wird von der D‘/D3-Domäne gebunden [42, 45].

2.3.1 Aufbau und Synthese des VWFs

Der mature VWF besteht nach der Translation aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und dem sezernierten VWF, der aus 2050 Aminosäuren besteht.
Der in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisierte VWF inklusive Pre- und Propeptid besteht aus 2813 Aminosäuren. Der VWF wird in unterschiedliche Domänen untergliedert. Die Untergliederung erfolgt in D1-D2-D‘-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK [44]. Die D1-D2-Domäne ist dabei das Propeptid, während die Domänen D9-CK den reifen VWF abbilden. Am C-terminalen Ende liegt der Cystein-Knoten (CK). In diesem Bereich kommt es im endoplasmatischen Retikulum zur Dimerisierung von zwei VWF-Molekülen. Dabei ist das Propeptid immer noch am VWF gebunden. Beim Transport durch das Trans-Golgi-Netzwerk kommt es zur Multimerisierung der VWF-Moleküle an den N-Termini, woraus die großen Multimere entstehen. Die Multimerisierung erfolgt über eine Disulfidbrückenbindung im Bereich der D’-D3-Domäne, sowie über einer Verbindung zwischen den Pro-Domänen in den

D1-D2-Regionen. Die D1-D2-Domäne wird als VWF-Propeptid abgespalten und ebenfalls ins Plasma sezerniert. Früher bezeichnete man das VWF-Propeptid auch als VWF-Antigen 2. Es folgen nun weitere posttranslationale Glykosylierungen und anschließend die Aufwickelung in einer Helix zu langen tubulären Strukturen, den Weibel-Palade-Körperchen. Bei Sekretion des VWF kommt es zur raschen Enthüllung des VWF [26, 39]. Die VWF Multimere können aus über 40 Subeinheiten bestehen. Der VWF ist damit das größte Plasmaprotein im menschlichen Körper [46].

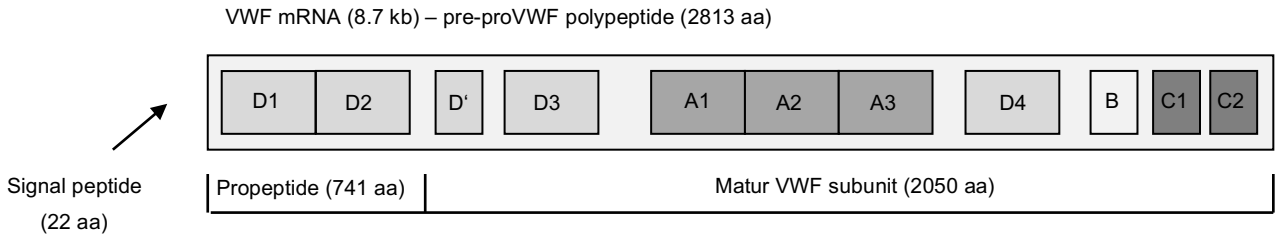

Abbildung 1: Schematische Darstellung des maturen VWF, adaptiert nach Ruggeri 2001 [42]

2.3.2 Funktion des VWF

Nativ liegt der VWF in einer irregulär aufgewickelten Form vor. Erst unter starken Scherkräften kommt es zur „Entfaltung“ des VWF [39, 42, 45]. Die langen VWF-Moleküle, die so genannten Multimere, können verschiedene Größen erreichen. Man unterscheidet kleine, mittlere, lange und ultra-lange Formen [45]. Die Adhäsionkraft des VWFs für Thrombozyten ist durch die Anzahl seiner Untereinheiten bestimmt, die zwischen 500 und über 10.000 kDa liegen kann. Die ULVWF-Moleküle erreichen dabei Molekülgrößen zwischen 5000–10000 kDa. Sobald es zur Entfaltung durch Scherkräfte kommt, kann der VWF schnell durch die ADAMTS13 in kleinere Stücke gespalten werden. ADAMTS13 spaltet dabei in der A2-Domäne zwischen Tyr1605-Met1606 (entprechend Tyr842-Met843 des maturen VWF). Die A2-Domäne entfaltet sich mit zunehmenden Scherkräften, sodass das Enzym ADAMTS13 spalten kann [39, 41, 42, 45].

Der VWF bildet bei der Blutstillung eine Brücke zwischen den Thrombozyten und dem subendothelialen Kollagen. Er ist in der Lage das Kollagen durch seine A3-Domäne zu binden und über die ebenfalls über Scherkräfte aktivierte A1-Domäre den GPIbα-Rezeptor der Thrombozyten [39].

2.4 ADAMTS13

1996 beschrieben Furlan [6] und Tsai [7] gleichzeitig ein bisher unbekanntes Enzym, welches den VWF spalten kann. Es handelt sich bei diesem Enzym um eine Metalloprotease, die aufgrund ihrer molekularen Struktur der ADAMTS-Familie zugeordnet werden konnte und daraufhin den Namen ADAMTS13 erhielt. Die Entdeckung der ADAMTS13 führte dazu, dass die Ursache für die angeborene und erworbene TTP gefunden wurde [8, 47, 48]. Durch die Gensequenzierung konnte die angeborene TTP nachgewiesen werden [49, 50]. Im Plasma von Patienten mit erworbener TTP konnten Autoantikörper nachgewiesen werden, die sich gegen die ADAMTS13 richteten [48, 51].

2.4.1 Synthese und molekularer Aufbau der ADAMTS13

Die ADAMTS13 wird vorwiegend in den hepatischen Sternzellen (synonym Ito-Zellen) synthetisiert und anschließend als aktives Enzym ins Plasma abgegeben. Die Protease wird in unterschiedliche Domänen unterteilt. Sie besteht aus einem Signalpeptid sowie einem Propeptid, die beide noch vor dem Sezernieren im Endoplasmatischen Retikulum entfernt werden. Weiter besteht die ADMTS13 aus einer Metalloprotease-Domäne, der Disintegrin-Domäne, einer Thrombospondin type 1 repeat-Domäne, einer cysteinreichen Domäne, der Spacer-Domäne, sieben weiteren Thrombospondin type 1 repeat-Domänen sowie zwei CUB-Domänen. Im aktiven Zentrum – der Metalloproteasen-Domäne (MP) – befindet ein Zink-Ion, das die Hydrolyse in der Bindungsstelle zwischen Tyr1605-Met1606 in der A2-Domäne des VWF-Moleküles koordiniert. Neben dem aktiven Zentrum liegt eine hochaffine Bindungsstelle für Ca^{2+}-Ionen, die ebenfalls essenziell für eine effiziente Spaltung des VWF ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Metalloproteasendomäne zusammen mit der Disintegrin-Domäne eine Funktionseinheit bilden [52-55].

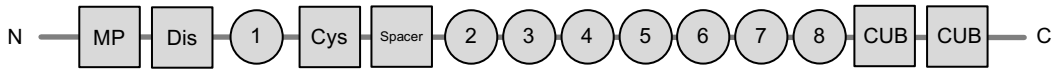

Abbildung 2: Schematische Darstellung der ADAMTS13 nach Zander et al. [52]

Metalloproteasedomäne (MP), Disintegrin ähnliche Domäne (Dis), Thrombospondin-1-Domäne 1 (1), Cystein-reiche Domäne (Cys), ADAMTS-Spacer (Spacer), Thrombospondin-1-Domänen 2-8, 2 CUB-Domänen (CUB)

Das Propeptid hat eine regulatorische Funktion und wirkt ähnlich wie ein Chaperon bei der Faltung der Protease (in Abbildung 2 nicht gezeigt). Das Propeptid besteht aus 41 Aminosäuren [9]. Die Metalloproteasendomäne der ADAMTS13 besitzt ein Zink-Ion, welches als Metallion die Proteolyse in der A2-Domäne des VWF an der Stelle Tyr1605-Met1606 steuert [56]. Die Disintegrin-ähnliche Domäne dient wahrscheinlich dazu die Spaltung des VWF zu beschleunigen und erhöht die Substrat-Spezifität. Mutationen in diesem Bereich zeigten eine deutlich herabgesetzte proteolytische Aktivität des ADAMTS13 [57]. Nach der Disintegrin-ähnlichen Domäne folgt die Thrombospondin type 1-Domäne mit der anschließend folgenden Cystein-reichen Domäne (Cys). Cystein-reiche Domänen finden sich in vielen verschiedenen Proteinen. Bei der ADAMTS13 wird angenommen, dass die Cystein-reiche Domäne direkt mit der A2-Domäne des VWF interagiert und somit eine wichtige Funktion für dessen Erkennen und Proteolyse hat [58]. Die Spacer-Domänen scheinen unter anderem für die Erkennung des VWF notwenig zu sein [59]. Die insgesamt acht Thrombospondin-1-Domänen haben unterschiedliche Funktionen. Während die Thrombospondin-1-Domäne 1 direkt an die A2-Domäne des VWF bindet, binden die anderen Thrombospondin-1-Domänen in der D4-Domäne des VWF oder an die Endothelzelloberfläche über den CD36-Rezeptor [60-62]. Die CUB1/2-Domäne ist an der Bindung der ADAMTS13 am VWF mit verantwortlich [44].

2.4.2 Funktion der ADAMTS13

ADAMTS13 wird als aktives Enzym ins Plasma sezerniert und liegt normalerweise in einer Konzentration von etwa 0,5-1 µg/ml vor. Bislang wurde noch kein natürlicher Inhibitor der ADAMTS13 identifiziert [63]. ADAMTS13 spaltet ULVWF-Moleküle hochspezifisch zwischen Tyr1605-Met1606 in der A2-Domäne [64]. Dabei hängt die proteolytische Spaltung des VWF vor allem von Scherkräften ab, welche die A2-

Domäne freilegen, so dass die ADAMTS13 spalten kann. Hohe Scherkräfte sind vor allem an den Aufgabelungen kleiner Arteriolen sowie in der Mikrozirkulation zu finden [65]. Im Ruhezustand zirkuliert die ADAMTS13 in einer geschlossenen Form und der VWF liegt in einer globulären Struktur vor. Zwischen beiden Molekülen findet in diesem Ruhezustand keine proteolytische Interaktion statt. Erst wenn der VWF im Bereich von verletzten Gefäßstellen an das subendotheliale Kollagen bindet, kommt es unter dem Einfluss von Scherkräften zur Konformationsänderung der A1-Domäne des VWF und es können die Thrombozyten über den GPIbα-Rezeptor binden. Parallel kommt es zur Entfaltung der VWF-A2 Domäne, was erst jetzt die darin enthaltende ADAMTS13-Spaltstelle zugänglich macht. ADAMTS13 bindet über die CUB1/2-Domänen an die D4-CK-Domäne des VWFs. Durch die Bindung kommt es zur Dissoziation der Spacer-Domäne von den CUB1/2-Domänen und die ADAMTS13 öffnet sich. Durch die Öffnung der ADAMTS13 erfolgt nun in einem Reissverschluss-Prinzip zuerst die Bindung der Spacer-Domäne dann der Cystein-reichen Domäne und schließlich der Disintegrin-ähnlichen Domäne im Bereich der A2-Domäne des VWF. Dies führt zu einer allosterischen Aktivierung der Metalloproteasedomäne, was zu einer Spaltung des VWF im Bereich Y1605-M1606 führt [66].

Das Phänomen, dass hohe Scherkräfte mit einer verstärkten Spaltung des VWF einhergehen, wurde sogar in Patienten beobachtet, die an einer schweren Aortenstenose leiden und gastrointestinale Blutungen aus Angiodysplasien zeigen, was als Heyde-Syndrom beschrieben wird und mit einem akquirierten Von Willebrand-Syndrom assoziiert ist, bei dem die grossen VWF-Multimere fehlen. Nach chirurgischer Korrektur der Aortenklappe kommt es bei den meisten Patienten zu einer Normalisierung der VWF-Multimere [67, 68].

2.5 Pathophysiologie

2.5.1 Von Willebrand-Jürgens-Syndrom (von Willebrand-Syndrom, VWS)

2.5.1.1 Klinische Erscheinung

Das VWS ist mit einer Prävalenz von bis zu 1% die häufigste Blutungsstörung. Klinisch tritt es vor allem durch eine Kombination von Hämophile-ähnlichen und petiechalen Blutungen auf. Typische Erscheinungen sind neben Nasen- und Schleimhaut-blutungen sowie gastrointestinalen Blutungen auch eine erhöhte Anzahl an postoperativen Blutungen [21]. Allerdings entwickelt die Mehrheit der Patienten mit einem VWS keine, oder nur geringe Symptome. Das symptomatische VWS wird mit einer Prävalenz von etwa 0,1% angegeben. Grundsätzlich kann zwischen einem erworbenen und einem angeborenen VWS unterschieden werden. Ein erworbenes VWS kann im Rahmen einer anderen Grunderkrankung, wie z.B. einer monoklonalen Gammopathie, malignen Lymphomen, myeloproliferativen Erkrankungen, autoimmunologischen Erkrankungen oder schweren Aortenklappenstenosen auftreten [69-72]. Auffällig ist, dass bei Menschen, welche die Blutgruppe 0 besitzen, die VWF-Konzentration um bis zu 35% niedriger ist als bei Menschen mit einer anderen Blutgruppe [73].

2.5.1.2 Einteilung des VWS

2.5.1.2.1 Angeborene VWS

Grundsätzlich werden bei dem angeborenen VWS drei Typen unterschieden, von denen es noch mal eine Einteilung in verschiedene Subtypen gibt [21]. In der Abbildung 3 ist zu sehen, in welchem Bereich des VWF die Mutationen vorliegen. Je nach Subtyp liegt eine Mutation in einem bestimmten Bereich des VWF vor.

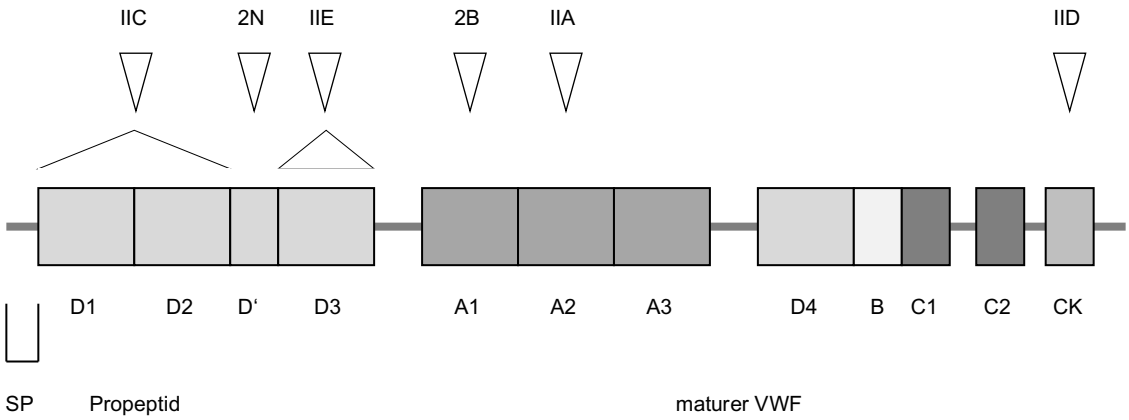

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mutationsbereiche des VWFs, nach Budde 2004 [37]

Beim VWS Typ 1 handelt es sich um einen quantitativen Defekt, der autosomal dominant vererbt wird. Dieser Typ ist gekennzeichnet durch eine gleichmässige Verminderung der Konzentration und der Funktion des VWF [24]. Ebenfalls fällt eine erniedrigte FVIII Konzentration auf. Wenn die Konzentration von VWF und FVIII mit <30% vermindert ist, oder wenn der VWF <50% liegt, bei gleichzeitigem Vorhandensein von klinischen Blutungen, spricht man von einem VWS Typ 1 [21, 74, 75].

VWS Typ 2

Der Typ 2 des VWS wird in vier Untergruppen eingeteilt. Es handelt sich beim Typ 2 um qualitative Defekte am VWF, die entweder autosomal dominant oder autosomal rezessiv vererbt werden können.

Typ 2A: Es kommt zur herabgesetzten Thrombozyten-Adhäsion, die durch einen Mangel an hochmolekularen VWF-Multimeren verursacht wird. In der Multimerenanalyse zeigt sich ein Fehlen bzw. eine Verminderung der großen und oft auch mittelgroßen Multimeren bei allen Subtypen. Ältere Klassifikationen teilen den Typ 2A nochmals in Sybtypen auf (IIA, IIC, IID, IIE, IIG, IIH) [24, 56, 73, 74]. Bei den einzelnen Subtypen des Typ 2A verursachen Mutationen Veränderungen in den einzelnen Domänen des VWF. Je nach Domäne kann ein unterschiedlicher Pathomechanismus vorliegen. Ein Pathomechanismus beruht unter anderem auf einer erhöhten Sensitivität des VWF von der ADAMTS13 gespalten zu werden [56].

Typ 2B: Der Typ 2B ist gekennzeichnet durch ein Fehlen der großen Multimere. Im Gegensatz zum Typ 2A zeigt sich beim Typ 2B eine erhöhte Affinität zum GPIbα-Rezeptor, was zu einer Thrombozytopenie führen kann. Die erhöhte Affinität ist auf eine „gain-of-function“ Mutation in oder in der Nähe der A1-Domäne zurückzuführen. Es kommt zu einer verstärkten Affinität des VWF an das GPIbα [76]. Der Typ 2B kann vom Typ 2A durch die positive Thrombozytenagglutination auf niedrige Ristocetinkonzentration, welche bei normalem VWF keine Agglutination bewirkt, unterschieden werden [24].

Typ 2M: Beim Typ 2M liegt eine abnormale Multimeren-Struktur vor, ohne dass es zu einem Fehlen der großen Multimeren kommt. Es liegt eine verminderte Interaktion mit den Thrombozyten oder dem Kollagen vor. Dies beruht zum einen auf einer reduzierten Affinität des VWF für die GPIbα-Bindungsstelle am VWF oder aber auf einer reduzierten Affinität des VWF für Kollagen [21, 76].

Typ 2N: Der Typ 2N ist charakterisiert durch eine gestörte FVIII-Bindung und kann so eine Hämophilie A vortäuschen [24]. Insbesondere bei männlichen Erkrankten, kann schnell beim Vorliegen eines Typs 2N der Verdacht einer Hämophilie geäußert werden. Grund sind vor allem Mutationen im Bereich der Bindungsstelle des FVIII zwischen Serin 764 und Arginin 1035 in der D’-D3-Region des VWF. Die FVIII-Konzentrationen sind im Vergleich zum von-Willebrand-Faktor-Antigen (VWF:AG) stark vermindert [74].

VWS Typ 3:
Bei Patienten mit einem VWS Typ 3 liegt ein fast vollständiger Mangel des VWF vor. Bei dem VWF Typ 3 fehlt sowohl die VWF:RCo (von-Willebrand-Faktor Risticetin-Kofaktor-Aktivität), die VWF:CB (von-Willebrand-Faktor Kollagenbindungsaktivität) als auch das VWF:AG [74]. Neben einer defekten primären Hämostase, die aufgrund des Mangels des VWF vorliegt, ist ebenfalls auch ein Defekt in der sekundären Hämostase zu beobachten, welcher auf einen begleitenden Mangel des FVIII zurückzuführen ist [24].

In Tabelle 1 sind die charakteristischen Befundkonstellationen der Typen des VWS nach Budde et al. zusammengefasst [73].

Tabelle 1: AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv, BZ = Blutungszeit

Typ	Erbgang	BZ	VIII:C	VWF:AG	VWF:RCo	VWF:CB	RIPA	Multimere	
								im Plasma	in Thrombozyten
1	AD	↑/N	↓	↓	↓	↓	N/↓	alle vorhanden	alle vorhanden
2A	AD/AR	↑	↓/N	↓	↓	↓	↓/N	große und/oder mittelgroße fehlen	Alle vorhanden oder wie Plasma
2B	AD	↑	↓/N	↓/N	↓	↓	↑↑	große fehlen	alle vorhanden
2M	AD	↑	↓/N	↓	↓/N	N/↓	↓/N	alle vorhanden	alle vorhanden
2N	AR	N	↓↓	N/↓	N/↓	N/↓	N	alle vorhanden	alle vorhanden
3	AR	↑↑	↓↓	Nomen nominandum (nn)	nn	nn	nn	nn	nn

Budde et al. beschrieb 2004 in *„Standardisierte Diagnostik des von-Willebrand-Syndroms“* die VWF-Multimerenmuster in Plasmen von verschiedenen Typen des VWS in einem mittelhoch auflösenden Agarosegel [73]. Das Normalplasma (N) sowie die Plasmen der Typen 2A (IB), 2A (IIA) und 2B zeigen Oligomere, die aus Triplets bestehen, während die Subtypen des Typ 2A (IIC, IID und IIE) ein verändertes Bandenmuster zeigen. Beim Typ 2A, Subtyp IIA sind die Satellitenbanden akzentuiert als Ausdruck einer verstärkten Proteolyse der VWF-Untereinheiten durch ADAMTS13.

2.5.1.2.2 Erworbenes VWS

Das akquirierte VWS (aVWS) ist eine erworbene Blutungsneigung, die durch qualitative oder quantitative Defekte des VWF charakterisiert ist. Es tritt meist im Rahmen von lymphoproliferativen Erkrankungen (48%), kardiovaskulären Erkrankungen (21%), myeloproliferativen Erkrankungen (15%), Neoplasien (5%) oder Autoimmunerkrankungen (2%) auf [72, 77]. Dem aVWS liegen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde. So wurden unter anderem eine reduzierte Synthese, eine erhöhte Adsorption an Tumorzellen oder Thrombozyten, ein beschleunigter Abbau durch Bindung an Autoantikörper sowie eine verstärkte Spaltung des VWF durch ADAMTS13 oder Plasmin beschrieben. Dicke et al. beschrieben mehrere verschiedene Mechanismen des aVWS bei Patienten, die an einer monoklonalen

Gammopathie litten. Hierbei wurde sowohl ein immunologisch beschleunigter, verstärkter Abbau vermutet, als auch eine durch Plasmin bzw. ADAMTS13 verstärkte Spaltung des VWF beschrieben [78]. Ebenso wurde in einem „Case Report“ von C.J. Eikenboom et al. bei einem Patienten mit Morbus Waldenstörm eine direkte Korrelation zwischen der Fibrinolyseaktivität und dem Spiegel der VWF:RCo beschrieben. Die Autoren schlussfolgerten, dass es sich bei dem Patienten um ein durch Hyperfibrinolyse ausgelöstes aVWS handeln müsse [79]. Ein erworbenes VWS findet sich auch bei Patienten, die ein „Left Ventricular Assist Device“ (LVAD) implantiert bekommen haben. Bei diesen Patienten wurde beobachtet, dass es zum Verschwinden der hochmolekularen Multimere des VWF kommt. Hier ist sehr wahrscheinlich, dass es zur exzessiven Spaltung des VWF durch die ADAMTS13 aufgrund der erhöhten Scherkräfte kommt. Durch die erhöhten Scherkräfte wird ein ähnliches Bild hervorgerufen, wie bei Patienten, die an einem VWS Typ 2A (Subtyp IIA) leiden [70]. Ein vergleichsweise ähnliches Bild zeigt sich bei Patienten, die an einer schweren Aortenklappenstenose leiden. Vincentelli et al. beschrieben, dass bei der Mehrzahl seiner 50 untersuchten Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose sich Fehlfunktionen der Thrombozyten zeigen, sowie ein Verlust der großen VWF-Multimere. Die Schwere der Aortenklappenstenose korrelierte dabei mit den hämostasologischen Veränderungen [80].

2.5.1.3 Diagnostik

Zur Erfassung eines angeborenen bzw. erworbenen VWS eignet sich vor allem eine ausführliche Anamnese [41, 73], da globale Gerinnungstests oftmals beim Vorliegen eines VWS nicht pathologisch verändert sind. Wegen der erheblichen Variabilität des VWS kann es sehr schwierig sein, die Diagnose eines VWS zu stellen. Der VWF ist ein Akut-Phase-Protein, welches zum Beispiel im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungen wie des rheumatischen Formenkreises, Vaskulitiden und malignen Tumoren stark erhöht sein kann. Ebenso kann der VWF aber auch während der Schwangerschaft erhöht sein und somit ein VWS maskieren. Zum Nachweis eines VWS gibt es verschiedene Labortests, die zum Teil in Routinelabors durchgeführt werden können, aber zum Teil auch in Speziallabors durchgeführt werden müssen [24]. Neben der heute kaum noch verwendeten Blutungszeit werden die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) die Thrombozytenzahl gemessen sowie die in-

vitro-Blutungszeit (PFA 100®). Die erweiterte Diagnostik sieht ein Messen der Faktor VIII-Gerinnungsaktivität (F VIII:C), VWF:Ag, VWF:RCo und der VWF:CB vor. Neben der erweiterten Diagnostik kann man eine spezielle Diagnostik anschließen. Ein Teil der speziellen Diagnostik beinhaltet neben molekularbiologischen Untersuchungen auch eine VWF-Multimere-Analyse. Diese VWF-Multimere Analyse gibt Auskunft über die Größe der Multimere und ob eine abnorme Konstellation dieser vorliegt. Die Methode wurde erstmals von Ruggeri und Zimmermann publiziert [69, 73]. Die VWF-Multimere werden in einem Agarosegel nach Denaturierunng mit SDS elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels eines Westernblots mit Lumineszenzdetektion dargestellt [41, 73].

2.5.1.4 Therapie des VWS

Die Therapie des aVWS ist meistens die Behandlung der Grunderkrankung. Sollte dies nicht zu einem ausreichenden Effekt und dem Rückgang der Symptomatik führen, gibt es noch die Option der symptomatischen Therapie mittels Desmopressin oder der Infusion von VWF-Konzentraten. Es wurde aber auch schon die erfolgreiche extrakorporale Immunadsorption bei einem Patienten mit einem aVWS beschrieben. Bei Patienten, die ein aVWS im Rahmen einer lymphoproliferativen Erkrankung oder Autoimmunerkrankung zeigen, ist die Therapie mit Immunglobulinen eine Alternative. Diese Alternative hilft allerdings nicht, wenn das aVWS im Rahmen eines Morbus Waldenströms auftritt. Diese Patienten sollten mit VWF-Konzentraten behandelt werden. Diese Therapie führt zwar nur zu einem temporären Ansprechen, ist aber die einzige Option, die einen gewissen therapeutischen Erfolg erzielt konnte [72].
Bei einem VWS Typ 1 ist eine Therapieoption, gerade in einer perioperativen Episode, die Substitution von Desmopressin. Desmopressin führt zu einer Freisetzung des VWF aus den körpereigenen Speichern, wie zum Beispiel den Endothelzellen. Alternativ kann bei einem Typ 1 auch die Gabe von Faktoren-Konzentraten erfolgen. Bei einem VWS Typ 2B sollte man zur Therapie kein Desmopressin geben, da es hier zu einer erhöhten Thrombozytenagglutination/-aggregation kommen kann. Der Typ 3 kann sowohl durch die Gabe von Faktoren-Konzentraten als auch durch eine Transfusion mit Thrombozyten behandelt werden [81].

2.5.2 Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura

2.5.2.1 Klinische Erscheinung der TTP

Amorosi und Ultmann analysierten bereits 1966 bei etwa 260 Patienten klinische und laborchemische Veränderungen mit einer TTP. Zu den beschriebenen Veränderungen gehörten eine hämolytische Anämie mit dem Nachweis von Fragmentozyten, Thrombozytopenie, neurologische Defizite, Nierenversagen und Fieber [4]. Die Trias aus einer Coombs-negativen hämolytischen Anämie mit Zeichen der intravasalen Hämolyse und Nachweis von Fragmentozyten im Blutausstrich, Thrombozytopenie und ischämischen Endorganschäden definiert eine thrombotische Mikroangiopathie. Neben Fieber und einer schweren Allgemeinsymptomatik leiden die Patienten oft auch an Störungen des zentralen Nervensystems in Form von Verwirrtheit, fokalen neurologischen Ausfällen und eventuell auftretenden Krampfanfällen sowie an einer meist milden Niereninsuffizienz [21].

2.5.2.2 Pathophysiologie der TTP

Moake et al. beschrieben 1982 ungewöhnlich große („ultra large“) VWF Multimere im Plasma von Patienten mit einer chronisch rezidivierenden Form der TTP [5]. Die ULVWF Multimere erschienen in den Remissionsphasen und verschwanden wieder in den akuten Schüben der TTP. Moake et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen den ULVWF-Multimeren und den wiederkehrenden TTP-Schüben. 1996 beschrieben Furlan et al. [6] und Tsai et al. [7] unabhängig voneinander eine spezifische Protease, die den VWF spaltet. Diese Protease wurde später ADAMTS13 genannt und ein schwerer Mangel der Protease als Ursache der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura identifiziert. Die Abnahme der Aktivität der ADAMTS13 kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden, wobei es letztlich dazu kommt, dass die ultragroßen VWF-Multimere nicht ausreichend gespalten werden und es zu einer thrombotischen Mikroangiopathie mit Gefäßverschlüssen kommt [67, 83]. Ein Jahr nach der Entdeckung der ADAMTS13 beschrieben Furlan et al. vier Patienten mit einer chronisch rezidivierenden TTP. Bei diesen Patienten konnten in Remission ULVWF-Multimere im Plasma nachgewiesen werden, sowie

eine fehlende Aktivität der ADAMTS13 [8]. 1998 wurde ebenfalls von Furlan et al. ein weiterer Patient mit einer schweren TTP über einen Zeitraum von 400 Tagen beschrieben, bei dem ein IgG-Autoantikörper nachgewiesen werden konnte, welcher die ADAMTS13-Aktivität hemmte [47]. Bei den meisten der untersuchten Patienten mit einer TTP lag der Grund desam Fehlens der ADAMTS13 am Vorliegen eines Autantikörpers, während ein kongenitaler Mangel sehr selten war [47, 48]. Abbildung 4 zeigt links schematisch die physiologischen Verhältnisse in der Blutstrombahn. Der ULVWF wird von der ADAMTS13 gespalten. Im rechten Bildausschnitt sieht man schematisch dargestellt die Pathologie der TTP. Der ULVWF wird nicht mehr von der ADAMTS13 gespalten und es kommt zu Mikrothromben und Zirkulationsstörungen in den Blutgefäßen.

Das hämolytisch urämische Syndrom ist eine der TTP sehr ähnliche Erkrankung. Sie ist durch eine hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und ein akutes Nierenversagen charakterisiert und ist in Deutschland die häufigste Ursache für ein akutes Nierenversagen im Kindesalter. In vielen Fällen geht dem HUS eine durch *Escherichia Coli* O157:H7 ausgelöste Enterokolitis voraus [84, 85].

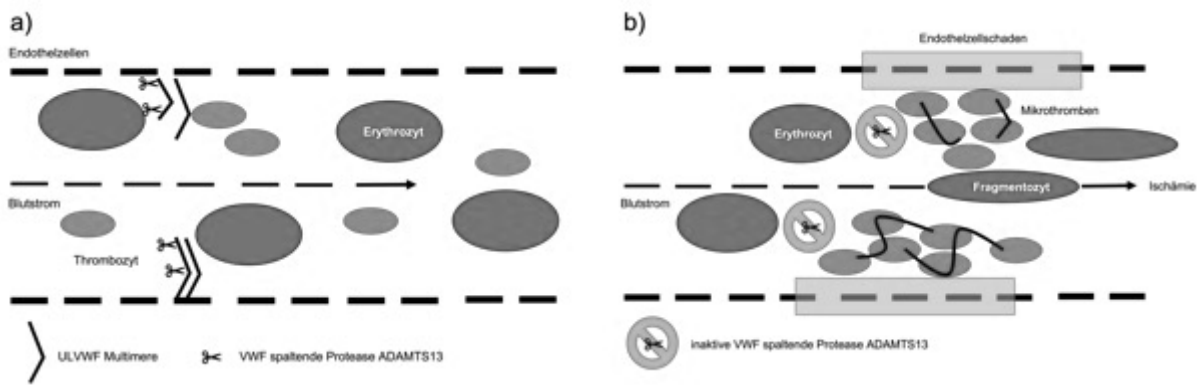

Abbildung 4: Darstellung der Pathophysiologie der TTP nach Ärzteblatt, Bommer et all [79]; a) normaler Blutfluss b) Zirkulationsstörung, Mikrothromben- und Fragmentozyten nach Endothelzellschaden bei thrombotischer Mikroangiopathie

2.5.2.3 Einteilung der TTP

Als Ursache für eine Verminderung der ADAMTS13 gibt es verschiedene Gründe. Zum einen kann ein angeborener Mangel in Form einer biallelen *ADAMTS13*-Genmutation die Ursache für einen ADAMTS13-Mangel sein. Diese familiäre Form wird auch Upshaw-Schulman-Syndrom genannt [54]. Upshaw beschrieb eine 29-jährige

Patientin, die seit ihrer Kindheit immer wieder an rezidivierenden Schüben einer Erkrankung litt, die mit Fieber, schweren Thrombozytopenien und hämolytischen Anämien einherging [86]. Upshaw vermutete selbst, dass ein ähnlicher Fall bereits von Schulman et al. beschrieben worden war [87]. Patienten die an einem Upshaw-Schulman-Syndrom (USS) leiden, haben einen genetisch bedingten Mangel an ADAMTS13, wodurch die ultragroßen VWF-Multimere nicht ausreichend gespalten werden können [83], [88]. Neben der sehr seltenen familiären Form der TTP gibt es auch die immunvermittelte Form (autoimmuno; iTTP), welche die häufigere Form der TTP darstellt. Aus noch ungeklärten Ursachen kommt es zur Bildung von hemmenden Autoantikörpern gegen die ADAMTS13, wodurch es zu einer Abnahme der ADAMTS13-Aktivität im Plasma kommt [83] [88] [89]. Das führt zu einer Bildung von Aggregaten aus VWF und Thrombozyten, was mit einer massiven Abnahme der Thrombozytenkonzentration einhergeht. Diese Aggregate verschließen als Mikrothromben die kleinen Gefäße, wodurch es zu ischämischen Organschäden und unbehandelt zu einem tödlichen Multiorganversagen kommen kann. Der Nachweis eines anti-ADAMTS13-Autoantikörpers in Kombination mit einem schweren Mangel von ADAMTS13 von weniger als 5 % des Normalwertes führt zur Diagnose einer erworbenen TTP [90]. Die quantitative Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität sowie des ADAMTS13-Inhibitors ist essenziell, um eine TTP von anderen Formen der thrombotischen Mikroangiopathien abzugrenzen [15, 91, 92]. Bei dem seltenen angeborenen Upshaw-Schulman-Syndrom ist eine Defizienz der ADAMTS13 charakteristisch. Je nach Art der Mutation kommt es zu einem Defekt der ADAMTS13 Synthese oder Sekretion. Es sind bereits über 150 verschiedene Mutationen der ADAMTS13 beschrieben worden. Dabei hängt es von der Art der Mutation ab, ob Patienten bereits im Kindesalter symptomatisch werden, oder die Krankheit erst später klinisch in Erscheinung tritt [2, 11, 93].

2.5.2.4 Therapie der TTP

Neben Beseitigung der möglichen kausalen Ursache beinhaltet die Therapie der TTP auch eine symptomatische Therapie bzw. die Therapie von Komplikationen [21]. Wichtigste therapeutische Maßnahme im Falle eines akuten TTP-Schubs ist der Austausch des Blutplasmas (Plasmapherese) mit Ersatz durch frisch gefrorenes Plasma, wodurch zum einen Antikörper gegen die ADAMTS13 dem Blut entzogen

werden und zum anderen aktive ADAMTS13 dem Empfänger hinzugefügt wird. Die aktuellen Leitlinien empfehlen bereits bei Verdacht auf eine TTP innerhalb der ersten vier bis acht Stunden eine Plasmapherese [15, 94]. Trotz einer Thrombozytopenie stellt eine Thrombozytentransfusion eine relative Kontraindikation dar [21, 95-98]. Goel et al. beschreiben, dass eine Thrombozytentransfusion bei TTP-Patienten mit einer erhöhten Mortalität in Form von arteriellen Thrombosen einhergeht. In einer Untersuchung mit 10624 TTP-Patienten zeigte sich nach Thromboyztentransfusion ein sechsfach erhöhtes Risiko, eine arterielle Thrombose zu entwickeln sowie ein zweifach erhöhtes Risiko, einen Myokardinfakt zu erleiden [99]. In eine andere Studie von Otrock et al. wurden 55 TTP Patienten retrospektiv beobachtet. Es gab drei Todesfälle, die in Assoziation mit der Thrombozytentransfusion standen. Die Autoren agumentierten aber, dass die Todesfälle ihrer Aussage nach nicht auf die Transfusion zurückzuführen waren, da die transfundierten Patienten sehr krank waren und wahrschenlich auch ohne Thrombozytentransfusion gestorben wären. Darüber hinaus verstarben die Patienten nicht an thromboembolischen Ereignissen, sondern aufgrund anderer Ursachen. Die Autoren agumentierten weiter, dass möglicherweise andere Patienten, die ohne Thrombozytentransfusion starben, durch eine Thrombozytentransfusion einen höheren gesundheitlichen Benefit gehabt hätten [100]. Die Autoren der derzeitigen Leitlinien über eine Thrombozytentransfusion von der *Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen* schreiben, dass bei Patienten mit HUS, TTP oder medikamentös ausgelöster mikroangiopathischer Hämolyse, selbst bei Blutungszeichen, eine Gabe von Thrombozytenkonzentraten kontrovers diskutiert wird. Die Thrombozytentrans-fusion könnte das Krankheitsbild verschlechtern. So wird derzeit nur bei schwerwiegenden Blutungen eine Thrombozytentransfusion empfohlen [101]. Eine Plasmapherese führt bei 70 % – 85 % der Patienten zum Ausklingen des akuten Schubes, wovon mehr als 50% bleibende Organschäden aufweisen. Die Letalität eines akuten Schubes beträgt aber dennoch 10 % – 20 %. Zusätzlich zur Therapie der autoimmunen TTP kommen neben Kortisonpräparaten auch Rituximab zum Einsatz. Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das Oberflächenmolokül CD20 gerichtet ist, was auf antikörperproduzierenden B-Zellen vorkommt. Rituximab ist aktuell offiziell für die Behandlung der TTP nicht zugelassen, gehört aber zur Standardtherapie an vielen behandelnden Zentren [102]. In vielen Studien zeigte sich, dass die Behandlung mit Rituximab die Behandlungsdauer verkürzt, das Rezidivrisiko

vermindert sowie die Remissionsdauer verlängert [103]. Als überbrückende Massnahme wird oftmals auch Caplacizumab verwendet. Dies ist ein humanisierter bivalenter Einzeldomänen-Antikörper („nanobody“) aus dem Lama, der an die A1-Domäne des VWF bindet und somit eine Verklumpung der Thrombozyten verhindert [104]. Eine immunsuppressive Therapie ist bei einem USS aufgrund des Fehlens der Autoantikörper nicht indiziert [15, 94, 105]. Die Splenektomie als Therapiemaßnahme wird heute nur noch sehr selten durchgeführt [83, 88].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Materialauflistung - Geräte

Gerät	Typ	Firma
Blotkammer	Trans-Blot® Cell	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Elektrophoresekammer	Mini- PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Gelgießkammer	Mini- PROTEAN Tetra Cell Casting Module	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Research Plus®, variabel 0,1-2,5 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
	Research Plus®, variabel 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	
Magnetrührer	NeoMag D-6010	NeoLab®, Heidelberg
pH-Meter	HI 2211	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein
Präzisionswaage	CPA 1003P	Sartorius, Göttingen
Schüttler	Shaker DOS-10L	NeoLab®, Heidelberg
Thermomixer	Thermomixer Compact 5350	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
Tischzentrifunge	Centrifuge 5418R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
Vortexmischer	Lab Dancer S40	IKA®-Werke GmbH und Co. KG, Staufen
Vortexer	DOS-L10	NeoLab®, Heidelberg
Zentrifuge	Allegra X-30R (Rotoren: F2402, SX4400)	Beckmann Coulter GmbH, Krefled
Überkopfrotor	Heidolph Reax2	Sigma-Aldrich GmbH
Tischrotor	Nutating Mixer	VWR International
Wasserbad mit Einsätzen	ED-AP (042)	Julabo GmbH, Seelbach
Western Blot-Detektionsgerät	ChemoCam Imager	INTAS Sciens Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Western Blot-Detektionsgerät	Fusion FX	Vilber®

3.1.2 Proteine, Enzyme, chemische Substanzen, Lösungen, Puffer und Antikörper

Tabelle 3: Materialauflistung Proteine und Enzyme

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller
Humaner Factor von Willebrand 1000	Willfact®	LFB Biomedicaments Courtaboeuf Cedex, France
Rekombinanter von Willebrand Factor	Baxter®	Baxter Innovations GmbH, Austria
Rekombinante ADAMTS13	Recombinant Human ADAMTS13 Protein, CF	R&D Systems®, Minneapolis, USA
Rekombinante ADAMTS13	Recombinant Human ADAMTS13 Protein, truncated	R&D Systems®, Minneapolis, USA
Plasmin	Human Plasmin 2100	Enzyme Resarach South Beach, USA

Tabelle 4: Materialauflistung Chemische Substanzen

Cyanogen bromide-aktivierte Sepharose 4B (Sigma C9142)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Chlorwasserstoffsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chemische Substanz	Hersteller
Rotiphorese® Gel (Acrylamide/Bisacrylamd 30%/0,8%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS 10x	AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteaseinhibitoren	Complete Mini, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, 1 Tablette pro 10 ml Extraktionslösung
Proteaseinhibitoren	Complete ULTRA, Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, 1 Tablette pro 50 ml Extraktionslösung
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithioerythreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iodacetamid (IAA)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropalnol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Temed (N, N, N', N' Tetramethyl-ethyldiamin)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Marker	Precision Plus Protein Dual Color Standard, Biorad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Entwicklerflüssigkeit Western Blot ClarityTM Western ECL Substrate	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Tween®20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pefabloc® SC	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA (Titriplex®III), Na_2-EDTA 2 H_2O	Merck KGaA, Darmstadt
Bariumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Applichem Panreac GmbH, Darmstadt

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Coupling-Puffer	0,25 M $NaHCO_3$, 0,5 M NaCl, pH 8,5-9,0 Ad 1000 ml Aqua dest
Blocking-Puffer	0,2 M Glycin, pH 8,0 Ad 200 ml Aqua dest
Phosphate buffered saline-Lösung (PBS)	10xPBS-Fertigprodukt, pH 7,4
Tris-buffered saline-Lösung (TBS)	10xTBS-Fertigprodukt
PBS-Proteinaseinhibitor-Lösung (PBS+PI)	PBS, 3 Tabletten(n) Roche Proteinaseinhibitor, pH 7,4, Ad 30 ml Aqua dest
Modifizierte PBS-Proteinaseinhibitor-Lösung (PBS+PI)	PBS, 300 mM NaCl, 1 Tablette(n) Roche Ultra Proteinaseinhibitor, pH 7,4, Ad 50 ml Aqua dest
Auftragspuffer	8 M Harnstoff, 0,1 M Tris-Base, 0,07 M Natriumdodecylsulfat, Ad 50 ml Aqua dest
Dithioerythreitol-Lösung (DTT)	0,2 M DTT Ad 1 ml Aqua dest
Iodacetamid-Lösung (IAA)	778 mM Iodacetamid Ad 0,5 ml Auftragspuffer Ad 0,5 ml BPB-Lösung
Bromphenolblau-Lösung (BPB)	0,14 M Bromphonolblau (BPB) Ad 10 ml Auftragspuffer
Trenngel Elektrophoese 16 ml (2 gels 1,5 mm)	9,34 ml Aqua dest, 2,66 ml 30 % Acrylamid, 4 ml 4x Resolving buffer, 0,16 ml 10 % APS, 0,016 ml Temed
Sammelgel Elektrophorese	3,08 ml Aqua dest, 0,67 ml 30 % Acrylamid, 1,25 ml 4x Resolving buffer, 0,05 ml 10 % APS, 0,005 ml Temed
4x Resolving buffer (Trenngelpuffer)	1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8 Ad 200 ml Aqua dest
4x Stacker buffer (Sammelgelpuffer)	0,6 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8 Ad 200 ml Aqua dest
Tris-Glycin-Puffer (TGS)	10x Tris-Glycin-SDS Fertigprodukt (Biorad Laboratories, Hercules, USA), 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS)
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol Ad 1000 ml Aqua dest
PBS-T-Lösung	20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 7,6
Gelfixierlösung	12,5 M Methanol, 1,667 M Essigsäure Ad 1000 ml Aqua dest
Thiosulfatlösung	0,8 mM Thiosulfatpentahydratstammlösung Ad 200 ml Aqua dest
Silbernitratlösung	12 mM $AgNO_3$ 2 mM, Formaldehyd (37 %) Ad 200 ml Aqua dest
Entwicklerlösung	566 mM Natriumcarbonat, 16 µM Thiosulfatpentahydratstammlösung, 5 mM Formaldehydlösung (37 %)

Stopplösung	13 mM EDTA (Titriplex)
Thiosulfatlösung	Thiosulfatpentahydratstammlösung 2%
BaCl2-Lösung	0,2 M $BaCl_2$
Harnstoff-Lösung	1,5 M Harnstoff, 5 mM Tris-OH, pH 8
EDTA-Lösung pH 8	0,2 M ETDA Triplex pH 8
Calciumchlorid-Lösung	$CaCl_2$
ADAMTS13 Cleavage Puffer	1,5 M Harnstoff, 5 mM TRIS-HCl, 0,1 % BSA, 10 mM CaCl2, pH 8.0
Plasmin Cleavage Puffer	TBS-Puffer, 0,15 M NaCl, 0,1 % BSA, pH 7.4

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Hersteller
anti-human von-Willebrand-Faktor "horseradish peroxidase (HRP)-markiert"	Kaninchen	polyklonal	DAKO A0082, Santa Clara, USA
IgG Negativkontrolle	Kaninchen	polyklonal	DAKO, Santa Clara, USA
anti-hVWF-A2-Antikörper (N-10 antibody)	Maus	monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA
HRP Ziege-anti-Maus IgG	Ziege	polyklonal	DAKO, Santa Clara, USA
M7[106]	Maus	monoklonal	Berkowitz, et al 1987
M31[106]	Maus	monoklonal	Berkowitz, et al 1987

3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Materialien zur Blutentnahme

Tabelle 7: Materialauflistung Blutentnahme

Butterlfy Safety-Multifly®	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
S-Monovette Coagulation 9NC/10ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
Handschuhe	Sempercare® premium M 7-8
Leukosilk®S	BSN medicalcare
OCTENIDERM Hautantiseptikum	Schüllke
Stauschlauch	
Tupfer	

Tabelle 8: Materialauflistung Verbrauchsmaterialien

SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß 2,0 ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
pH-Papier Universal Indikatorpapier pH 1-14	Macherey-Nagel
Blotting-Filterpapier Whatman™ 17CHR	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK
PVDF-Membranen	Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membrane 0,45µm
Pipettenspitzen Ep T.I.P.S. 50-10	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Pipettenspitzen TipOne 200µl Yellow Tip	StarLab, Hamburg
Pipettenspitzen TipOne 10µl XL graduated tip	StarLab, Hamburg
Transferpipetten Einmal-Pasteurpipetten mit integrietem Saugball 3,5 ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht
Cellstar Tubes® 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nitrocellulose Membranen	Filtertyp 0,025µm Merck Darmstadt
Zellstofftücher	

Wägeschälchen	
Aqua dest.	
Spritzflasche	

3.1.4 Software

Tabelle 9: Software

Vilber Lormat analysis software	Vilber Lourmat, France
ChemoStar	INTAS Science Imagine Instruments GmbH, Göttingen
Microsoft Office 2007 für Windows: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Anreicherunng des VWF aus humanem Plasma

3.2.1.1 Vorbereitung der CNBr-aktivierten Sepharose 4B und Liganden Kopplung

Im ersten Schritt wurden 0,2 Gramm (g) Cyanogen bromide-aktivierte-Sepharose® 4B (CNBr-aktivierte Sepharose 4B) in einer Feinwaage abgewogen und in ein 2 Milliliter (ml) Reaktionsgefäß gefüllt. Bromcyan ist über die Hydroxylgruppen mit der Agarose verbunden und bildet Cyanester oder Imidcarbonate, die bei leicht basischem pH-Wert schnell primäre kovalente Amide binden können. Proteine werden so über Bromcyan mit der Agarose verbunden [107]. 0,2 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B ergaben ein Volumen von etwa 480 - 500 µl. Nach dem Abwiegen wurden die CNBr-aktivierte Sepharose 4B in 1 mM, bei 4 °C gekühlter Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure, HCl) gequollen. Die HCL verhinderte die Aktivierung von reaktiven Gruppen, die bei einem hohem pH-Wert hydrolysiert würden. Gleichzeitig wurde noch vorhandene Laktose aus der Probe gewaschen. Die Laktose war Bestandteil der gekauften CNBr-aktivierten Sepharose 4B und diente der Stabilisierung der CNBr-aktivierten Sepharose 4B während der Lyophilisation. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde insgesamt fünf Mal mit 1 Millimol (mM) HCl gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Probe immer bei 12000 xg für 5 Minuten zentrifugiert, um ein Pellet an CNBr-aktivierter Sepharose 4B zu erhalten und die Salzsäure ohne Verlust von CNBr-aktivierter Sepharose 4B abzupipettieren. Nach dem Entfernen der Salzsäure wurde die CNBr-aktivierte Sepharose 4B in basischem Coupling-Puffer gewaschen. Der Coupling-Puffer bestand aus 0,25 Mol (M) Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) und

0,5 M Natriumchlorid (NaCl), das in Aqua dest. gelöst war. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde zwei Mal in Coupling-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen, so dass der pH-Wert über 8 lag. Zur Messung des pH-Werts wurden die CNBr-aktivierte Sepharose 4B bei 12000 xg abzentrifugiert und ein kleiner Tropfen aus dem Überstand entnommen. Dieser wurde mittels eines Lackmuspapiers geprüft, ob der pH-Wert über 8 lag. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B konnte nun mit einem polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörper (DAKO A0082) gekoppelt werden. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 3,1 Milligram pro Milliliter (mg/ml) vor. Auf 30 µl der CNBr-aktivierte Sepharose 4B sollte insgesamt eine Menge von 180 Mikrogram (µg) des polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörpers binden. (Abbildung 5). Bei einem Volumen von etwa 480 Mikroliter (µl) Beads benötigte man 929 µl des polyklonale Kaninchen anti-human VWF-Antikörpers in der Stammkonzentration von 3,1 mg/ml. Zur Verdünnung des Antikörpers wurde Coupling-Puffer verwendet. Damit sich die CNBr-aktivierte Sepharose 4B besser mit den polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörpern verbinden konnten, wurde das Volumen auf zwei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht für 12 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubation wurde die CNBr-aktivierte Sepharose 4B bei 12000 xg zentrifugiert und der Überstand wurde entnommen. Als nächstes wurde die CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Blocking-Puffer bei einem pH von 8,5 für zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Der Blocking-Puffer bestand aus 0,1 M TRIS-HCl, was in Aqua dest. gelöst war. Der Blocking-Puffer diente zum Absättigen noch aktiver Bindungsstellen. Dabei sollte die sich die Aminogruppe des TRIS mit einer reaktiven Gruppe der CNBr-aktivierten Sepharose 4B verbinden. Nachdem die CNBr-aktivierte Sepharose 4B zwei Stunden mit TRIS-HCl blockiert wurde, wurde der Blocking-Puffer entfernt. Um alle Reste des Blocking-Puffers zu entfernen, wurden die CNBr-aktivierte Sepharose 4B alternierend jeweils drei Mal in Coupling-Puffer und in saurem Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Der Waschpuffer bestand aus 0,1 M Essigsäure und 0,5 M NaCl in Aqua dest. Am Ende wurde die CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Coupling-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B konnten nun entweder direkt für eine Adsorption des VWF aus Plasma verwendet werden oder mit 0,02% Natriumazid (NaN_3) versetzt und konnte bei 4-8 Grad Celsius (°C) gelagert werden. NaN_3 diente als bakteriostatisches Mittel, um eine Keimkontamination zu verhindern. Aus den zwei Eppendorf Gefäßen mit je 2 ml gelöster CNBr-aktivierte Sepharose 4B, konnten pro Gefäß acht Portionen mit jeweils

250 µl entnommen werden. Diese 250 µl enthielten dann circa 30 µl der mit dem polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörper gekoppelten CNBr-aktivierten Sepharose 4B.

Zu 30 µl CNBr-aktivierter Sepharose 4B, die mit polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörper gekoppelt war, wurden 1000 µl 1:4 verdünntes humanes Plasma gegeben und in einem 2 ml Eppendorf Gefäß zwei Stunden lang in einem End-over-end Mischer bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasma wurde mit TBS-Puffer verdünnt. Ziel war es, dass der VWF im Plasma komplett an die anti-human VWF-Antikörper CNBr-aktivierte Sepharose 4B bindet. Der TBS-Puffer wurde zuvor mit einem Proteaseinhibitor (Complete, Roche®) ohne EDTA versetzt. Damit wurde verhindert, dass Proteasen den VWF noch spalten könnten. Die Plasmaproben wurden zuvor bei -80 °C gelagert und langsam bei 37 °C aufgetaut. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Sepharose-Beads bei 12000 xg zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Aliquots des Überstandes wurden angefertigt, aus denen man zur Kontrolle der VWF-Adsorption an die Sepharose-Beads das VWF:AG bestimmen konnte. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in TRIS-Puffer mit 300 mM NaCl, pH 7,4 bei Raumtemperatur gewaschen, der ebenfalls einen EDTA freien Proteaseinhibitor (Complete, Roche®) enthielt. Der Waschschritt wurde insgesamt vier Mal wiederholt. Die gewaschene CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde vorsichtig in dem Puffer suspendiert und anschließend ließ man die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wieder sedimentieren, bis sich ein klar sichtbarer Übergang zwischen der CNBr-aktivierten Sepharose 4B und dem Puffer gebildet hatte. Anschließend wurde der Überstand abgenommen.

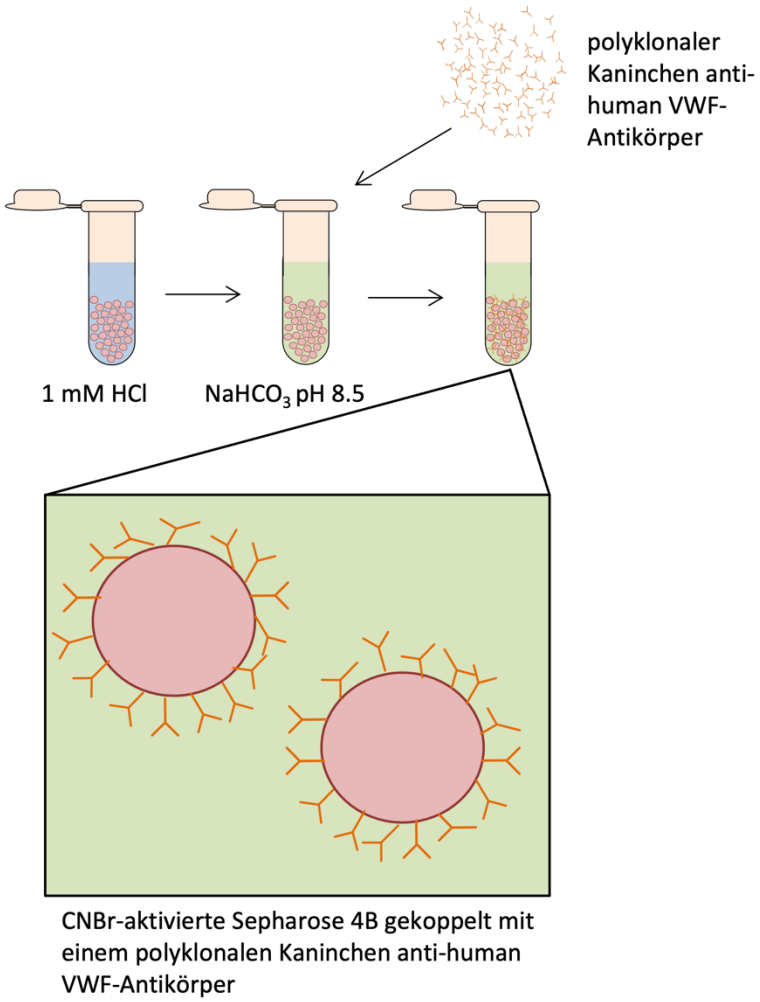

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kopplung der CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit einem polyklonalen Kaninchen anti-human VWF-Antikörpern

3.2.1.2 Adsorption des humanen VWF an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Zu den 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden nach der VWF-Adsorption 20 µl Auftragspuffer gegeben. Der Auftragspuffer enthielt 8 M Harnstoff, 0,1 M TRIS und 0,07 M Natriumdodecylsulfat. Zusätzlich wurden 2,5 µl Dithiothreitol-Lösung (DTT-Lösung) hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe bei 95 °C für zehn Minuten erhitzt. Ziel war es, dass die Proteine in der Probe denaturierten. Die DTT-Lösung reduzierte die Disulfidbrücken der Proteine [108]. Im Anschluss wurden noch einmal 2,5 µl DTT-Lösung hinzugegeben und die Probe wurde weiter für zehn Minuten, bei Raumtemperatur, unter ständigem Schwenken auf einem Schüttler, inkubiert. Im Anschluss wurden der Probe 5 µl Iodacetamid-Lösung (IAA-Lösung) hinzugefügt und

für weitere 15 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Iodacetamid diente zum Alkylieren von Cysteinresten der Aminosäuren [109]. Damit wurde verhindert, dass die Proteine nach dem Abkühlen wieder neue Disulfidbrücken ausbilden konnten (Abbildung 6 und 7). Neben dem IAA enthielt die IAA-Lösung auch noch Auftragspuffer und Bromphenolblau-Lösung. Bromphenolblau diente als Farbstoffmarker, damit später beim Beladen der Geltaschen die Proteinfront sichtbar war. Die Proben wurden im Anschluss entweder direkt auf ein Polyacrylamid-Gel gegeben, oder bei -20 °C eingefroren und gelagert.

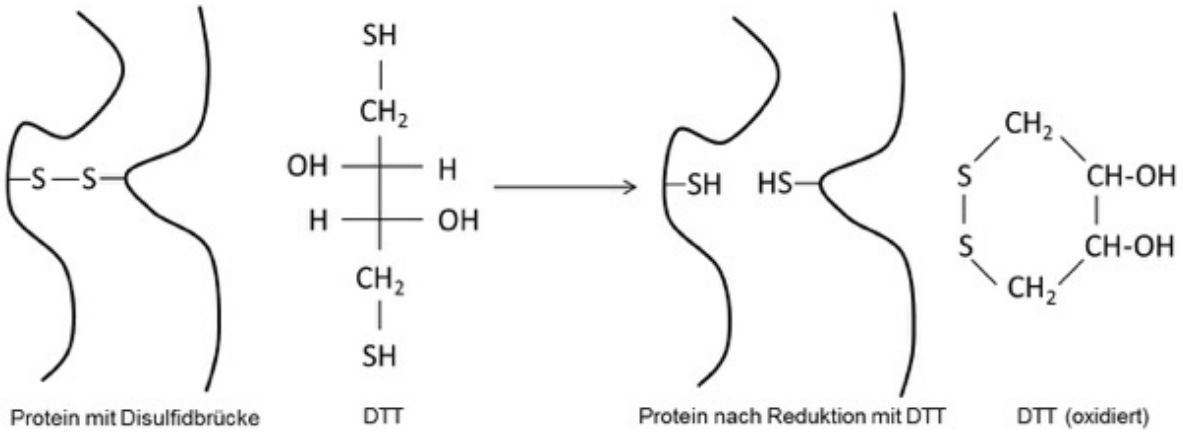

Abbildung 6: DTT in Reaktion mit Proteinen

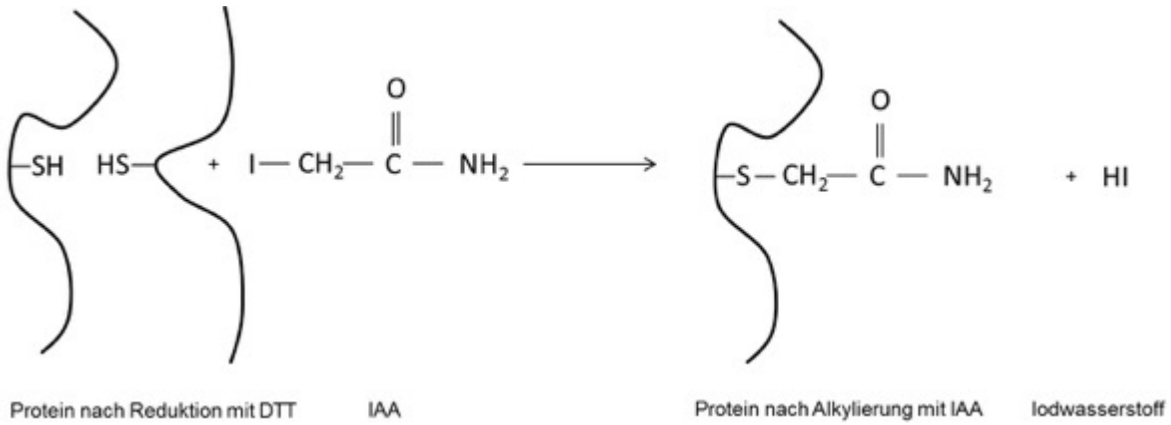

Abbildung 7: Reduzierte Proteine mit DTT in Reaktion mit IAA

3.2.1.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE und das anschließende Western Blot-Verfahren sind Standardmethoden zum Nachweis von Proteinen. Bei unseren Versuchen erfolgte die SDS-PAGE stets unter reduzierten Bedingungen. Nachdem passende Gele gegossen wurden, wurden die Proteine der Größe nach in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Kombination von SDS mit einem „discontinuous polyacrylamid gel“ wurde erstmals 1970 von U. K. Laemmli beschrieben [110]. Zur Detektion des VWF wurde ein 5%iges Gel gewählt. Da der VWF über eine 250000 Dalton (Da) Untereinheit verfügt, wurde ein niedrig prozentiges Gel gewählt [26]. Zum Gelegießen diente ein dafür konzipiertes System der Firma Biorad™. In einen Gel-Gießstand wurden zwei Glasplatten eingespannt, die durch einen Abstandshalter („Spacer“ mit 1,5mm Dicke) von einander getrennt wurden. Das Gel bestand aus zwei Anteilen – einem „Stackinggel“ und einem „Resolvinggel“. Das Gel wurde nach beschriebenem Rezept aus Tabelle 5 hergestellt. Die Grundlage der Polyarcylamidgele war die radikalische Polymerisation, bei der die Stoffe Acrylamid und N,N′-Methylenbisacrylamid quervernetzten. Nachdem Aqua dest. mit dem Resolving-Puffer für das Trenngel bzw. Stacker-Puffer beim Sammelgel mit dem Resolving-Puffer bzw. Stacker-Puffer gemischt wurden, wurde das Acrylamid hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Addition mit den Radikalstartern Ammoniumperoxodisulfat (APS) und mit dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Die Lösung musste nach der Zugabe von APS und TEMED zügig zwischen die beiden Glasplatten gegossen werden. Zuerst wurde das Trenngel in den dafür vorgesehen Raum gegossen und direkt im Anschluss mit Isopropanol überschichtet. Isopropanol war zum einen notwendig, um eine Glättung der Oberfläche zu erzielen und zum anderen, um den Kontakt mit Luftsauerstoff zu unterbinden. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, mit Aqua dest. ausgespült und mit einem Filterpapier getrocknet. Im Anschluss wurde das Resolvinggel auf das Stackinggel gegossen. In das Stackinggel wurde ein Kamm hineingesteckt, der insgesamt zehn Taschen im Gel bildete. In den Taschen selbst passte ein Volumen von maximal 60 µl. Nachdem das Stackinggel auspolymerisiert war, konnte das Gel entweder direkt verwendet werden oder es konnte in einer feuchten Kammer bei 4 °C gelagert werden.

Die Proben wurden im Vorfeld mit SDS im Überschuss behandelt. SDS ist ein anionisches Tensid, das alle Proteine in der Probe mit einer konstant negativen

Ladung überdeckte und somit die Eigenladung der Proteine überlagerte. 1 g Protein bindet 1,4 g des SDS. Auf diese Weise wurde die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nur noch von der Molekülgröße beeinflusst. Das vorbereitete Gel wurde nun in den passenden Fixierrahmen gesteckt und der Fixierrahmen mit dem Polyarcylamidgel zusammen in den Puffertank eingesetzt. Im Anschluss wurde ausreichend Lauf-Puffer in den Puffertank gegeben. Dabei war das Gel komplett von Puffer bedeckt. Die Proben mit der CNBr-aktivierte Sepharose 4B, an welche der VWF aus dem Plasma adsorbiert worden war, hatte ein Endvolumen von 60 µl. Die Taschen erlaubten ein Volumen von maximal 60 µl der Probe aufzunehmen. Das komplette Probenvolumen wurde nun in die dafür vorgesehenen Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Zusätzlich wurde in die erste Tasche 5 µl eines Markerprotein-Gemisches (Precision Plus Protein ™Standards) pipettiert. Die Kammer wurde nach dem Beladen mit den Proben abgedeckt und eine Spannung von 90 V wurde angelegt, damit die Proteine vorsichtig in das Gel eintreten konnten. Nach zehn Minuten wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektroden der Kammer waren so angebracht, dass die Kathode oben an der Auftragsstelle der Proben war und die Anode sich am Boden, am Ende des Polyacrylamidgels befand. (Abbildung 8) Die Wanderungsdistanz war abhängig von der Molekülgröße. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wanderten so vom oberen Ende des Gels an der Auftragsstelle von der Kathode in Richtung der Anode am Ende des Poylacrylamidgels. Nach 100 Minuten wurde die Spannung wieder entfernt.

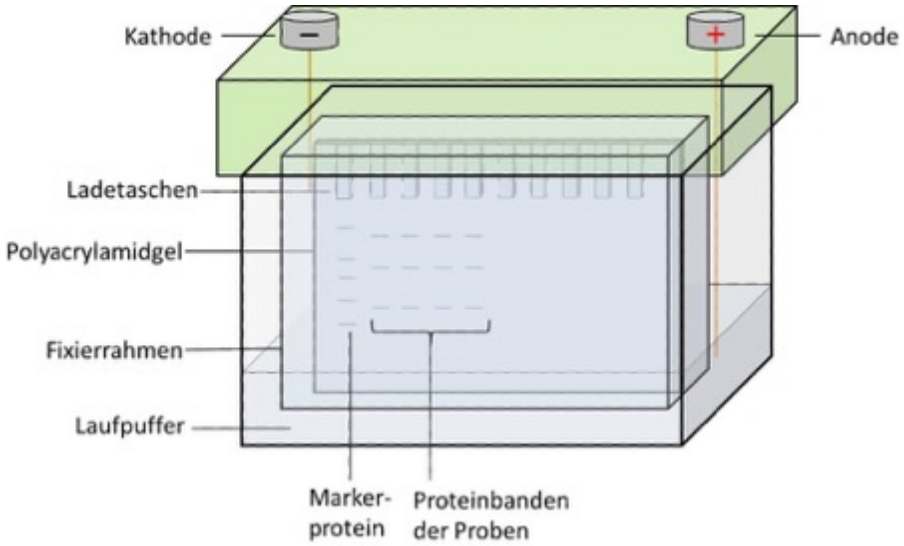

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Elektrophoresekammer

3.2.1.4 Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Membran zu transferieren, wurde ein Western Blot-Verfahren angewandt. Hierbei handelte es sich um einen elektrischen Proteintransfer vom Gel auf auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran). Dabei wurden die Proteine immobilisiert. Das Polyacrylamidgel wurde aus dem Fixierrahmen herausgenommen und in eine Schüssel mit Transferpuffer vorsichtig abgeschwemmt. Die PVDF-Membran wurde durch 99% Methanol aktiviert und auf das Polyacrylamidgel im Transferpuffer gegeben. Für den Transfer der PVDF-Membran aus dem Methanol und um die PVDF-Membran vorsichtig auf das Polyacrylamidgel zu lenken, wurde eine Metallpinzette benutzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass lediglich die Ränder der PVDF-Membran berührt wurden. Im Anschluss wurden beidseitig mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Mit einer Messpipette wurden Luftblasen, die sich zwischen dem Polyacrylamidgel und der PVDF-Membran bildeten, durch vorsichtiges Rollen der Pipette auf der Membran entfernt. Nachdem alle Luftblasen entfernt waren, wurde der Blot in die Blotkammer platziert. Die Blotkammer war so aufgebaut, dass sich senkrecht zum Poylacrylamidgel ein elektrisches Feld ausbreiten konnte. Die Blotkammer war komplett mit Transferpuffer gefüllt. Beim Einlegen des Blots in die Blotkammer musste darauf geachtet werden, dass der Blot so eingespannt wurde, dass die PVDF-Membran auf der Anodennseite der Blotkammer lag (Abbildung 9). Es wurde eine Spannung von 70 V für insgesamt 100 Minuten angelegt. Die Blotkammer wurde für den Transfer in eine Kühlkammer bei 4°C gestellt. Die negativ geladenen Proteine wanderten aus dem Polyacrylamidgel in Richtung der Anode auf die PVDF-Membran. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran vorsichtig mit einer Metallpinzette am Rand genommen und für 45 Minuten in ein Schälchen mit 5% „Bovine serum albumin“-Lösung (BSA-Lösung) gelegt. Das BSA war in TBS-Puffer gelöst. Das BSA diente zum Blockieren der Membranen. Zur Detektion des VWF auf der PVDF-Membran sollte später ein Antikörper eingesetzt werden. Da PVDF-Membranen Proteine binden können und die Antikörper nicht unspezifisch auf der Membran binden sollten, wurde die Membran mit dem BSA blockiert. So konnten später keine Antikörper unspezifisch auf der Membran binden, sondern lediglich an dem VWF.

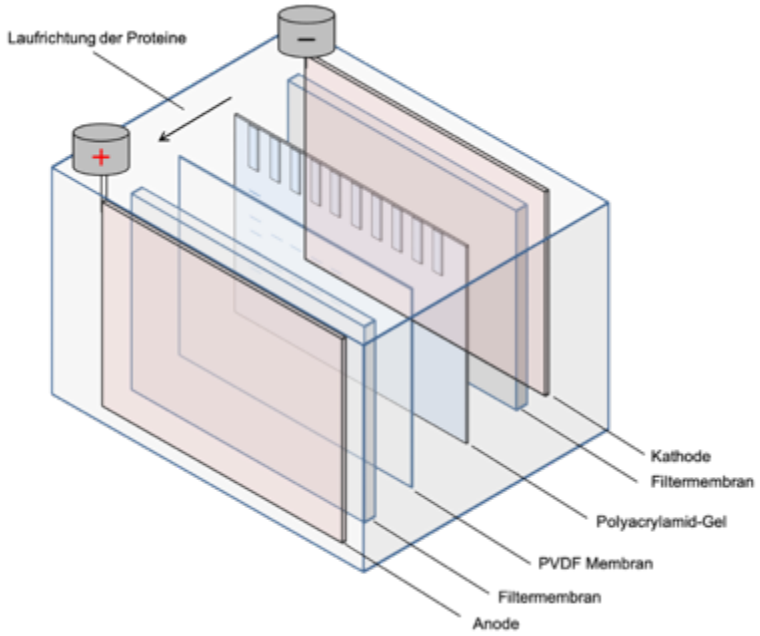

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Western Blot Kammer

Für die Entwicklung der Blots wurde ein polyklonaler “horseradish peroxidase-markiert” (HRP) anti-human von-Willebrand-Faktor benutzt (DAKO, Cat-Nr. P0226). Der Antikörper wurde 1:500 in 5% BSA mit TBS-Puffer verdünnt. Insgesamt wurden 5 ml dieser Verdünnung angesetzt und in eine Plastikfolie zusammen mit der PVDF-Membran gegeben. Die Folie wurde luftdicht verschlossen und bei 4 °C über Nacht auf einem Rotor inkubiert. Nach der Inkubation wurde die PVDF-Membran entnommen und vier Mal für 15 Minuten mit PBST-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde mit 5% Tween-20 versehen. Tween ist ein Tensid und sollte unspezifische Bindungen des Kaninchen HRP-gekoppelten anti-VWF-Antikörper mindern [111]. Für die Entwicklung der Blots wurde ein Entwicklungsystem der Firma Intas® verwendet, das auf dem Prinzip der Chemolumineszenz beruht. Chemolumineszenz ist ein Verfahren, bei dem durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Bereichs freigesetzt wird. Grundlage ist der Übergang eines Elektrons in einen angeregten, energiereichen Zustand, der durch eine chemische Reaktion erzeugt wird. Bei der Rückkehr in den Ursprungszustand des Elektrons wird die dabei freiwerdende Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung emittiert [112]. Die PVDF-Membran wurde auf eine Glasplatte, auf der eine Folie lag, gelegt. Anschließend wurden Luminol-Lösung und Peroxid-Lösung im

Verhältnis 1:1 gemischt und auf den Blot pipettiert. Die Glasplatte wurde in die Detektionskammer gestellt. Das Luminol wurde durch die „horseradish peroxidase“ des Kaninchen anti-VWF-Antikörpers mit Hilfe des Peroxids oxidiert. Dabei wurde dem Luminol Energie zugeführt und so konnte der VWF auf der PVDF-Membran detektiert werden, da die HRP-gekoppelten Antikörper den VWF banden und dort die Luminolreaktion erfolgte, welche mit der Kamera sichtbar gemacht wurde. Dabei konnten unterschiedliche Belichtungszeiten gewählt werden. Die Bilder wurden im Anschluss als „*tagged image file format-Datei*“ und als „*joint photographics group-Datei*“ gespeichert. Nach der Detektion wurde die Entwickler-Lösung abgewaschen und der Blot konnte getrocknet werden. Die Immunoblots wurden bei -4 °C gelagert.

3.2.1.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung diente als Verfahren zur Anfärbung von Proteinen nach der Elektrophorese. Die Methode der Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen stammt ursprünglich von Kerenyi and Gallyas [113]. Wir verwendeten eine Modifizierung nach Blum et al. [114]. Wir nutzen diese Methode, um zu sehen, ob noch Restproteine nach dem Transfer im Gel vorhanden waren. Nach dem Transfer vom Western Blot wurde das Polyacrylamid-Gel über Nacht in eine Gelfixierlösung gelegt. Die Essigsäure und das Ethanol in der Gelfixierlösung denaturieren die Proteine im Polyacrylamid-Gel, so dass diese ausfielen. Nachdem das Polyacrylamid-Gel über Nacht in der Gelfixierlösung lag, wurde dieses dreimal für 20 Minuten mit 30% Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte ein einminütiger Waschschritt in einer Thiosulfat-Lösung, der eine Hintergrundverfärbung verhindern sollte, sowie drei Waschschritte für 20 Sekunden mit Aqua dest. Danach kam das Polyacrylamid-Gel für 20 Minuten in ein Färbebad mit der Silbernitratlösung. Am Ende wurde durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. die Farbe entfernt und die Entwicklerlösung auf das Polyacrylamid-Gel gegeben. Der Entwicklungsschritt bewirkte, dass die Silberionen durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert wurden und sich die Stellen, an denen Proteine vorhanden waren, braun-schwarz färbten. Die Entwicklung wurde durch eine EDTA haltige Stopplösung (Titriplex®) abgebrochen. Die Stopplösung wurde nicht mehr vom Gel entfernt und es wurde direkt ein Bild gemacht. Die Bilder wurden im Anschluss als „*tagged image file format-Datei*“ und als „*joint Photographics Group-Datei“* gespeichert.

3.2.2 Untersuchung zur Intensität der Absorption des VWFs und seiner proteolytischen Spaltprodukte – Dialyse-System

Zum Verdau des VWF wurde Willfact® benutzt, ein aus humanem Plasma gereinigter VWF mit einer Stammkonzentration von 100 U/ml. Um die „cleavage site“ des VWFs möglichst zugänglich zu machen, wurde eine Dialyseflüssigkeit benutzt. Die Dialyseflüssigkeit war mit 1,5 M Harnstoff und 5 mM TRIS-Puffer bei einem pH-Wert von 8,0 angesetzt. Die Methode zur Dialyse wurde nach Furlan et al. angewandt [6]. Ein schematischer Aufbau der Dialyse ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Denaturierung war notwendig, damit der gefaltete VWF seine Form verliert, sich ausbreitet und so möglichst komplett von der ADAMSTS13 gespaltet werden kann. Von der Dialyseflüssigkeit wurden 50 ml in ein passendes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Auf die Dialyseflüssigkeit wurde eine hydrophile Nitrocellulose-Membran gelegt, die oben auf der Dialyseflüssigkeit schwamm. Die hydrophile Membran hatte eine Porengröße von 0,0025 µm. Der VWF selbst gelangte nicht durch die Poren der Membran in das Dialysat, wohl aber andere Anteile des Plasmas, die durch die Poren diffundierten. Humanes Plasma eines Kontrollprobanden wurde 1:20 mit TBS-Puffer pH 7,4 verdünnt. Zusätzlich wurde 1 mM Pefabloc® hinzugegeben. Pefabloc® diente zur Hemmung von möglicher Serinproteasen oder anderer Proteasen. Pefabloc® beeinflusste aber nicht die Aktivität der ADAMTS13. Um eine optimale Funktion der ADAMTS13 zu ermöglichen und möglichst viele zweiwertige Kationen anzubieten, wurden 95 µl vom 1:20 verdünnnten Plasma mit 5 µl einer 200mM Bariumcholrid-Lösung gemischt. So kam man auf eine Endkonzentration von 10 mM Bariumchlorid ($BaCl_2$). Im nächsten Schritt wurde das Plasma für fünf Minuten bei 37 °C aktiviert. Zu 100 µl verdünnter Plasmaprobe wurden 50 µl Willfact® mit einer Konzentration von 5 U/ml pipettiert. Da die Ursprungskonzentration des Willfact® bei 100 U/ml lag, wurden das Willfact® mit TBS-Puffer 1:20 verdünnt. Humanes Plasma eines Kontrollprobanden für die Negativkontrolle wurde in einem Eppendorfgefäß 30 Minuten lang bei 60 °C in einem Hitzeblock hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Plasma bei 12.000xg zentrifugiert, so dass sich ein Überstand absetzt, der für die Probe entnommen wurden konnte. Das hitzeinaktivierte Plasma wurde 1:20 mit TBS-Puffer verdünnt. Anschließend wurde 1 mM Pefabloc®, 50 µl in TBS-verdünntes Willfact® mit einer Konzentration von 5 U/ml und 10 mM EDTA hinzugegeben. Die

Probe wurde mit TBS-Puffer, der mit einem EDTA freien Proteaseinhibitor (Complete, Roche®) versetzt war, auf 1000 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Adsorption nach der bisher beschriebenen Methode einschließlich der SDS-PAGE und eines Western Blots. Auf die hydrophile Membran wurden vorsichtig insgesamt 150 µl Probe pipettiert, ohne dass die Membran berührt wurde. Anschließend wurden die Falcon-Tubes mit Deckeln verschlossen. Die Membran durfte weder sinken noch durfte die Dialyseflüssigkeit auf die Membran gelangen und so die Probe verdünnen. Die Probe wurde erschütterungsfrei in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert, da so ein Temperaturoptimum für die ADAMTS13 gegeben war. Je nach Anzahl der Proben konnte unterschiedlich lang inkubiert werden und damit konnte auch die Menge des gespaltenen VWF beeinflusst werden. Nach der Inkubation wurde vorsichtig die Probe wieder von der Membran pipettiert, ohne dabei mit der Pipettenspitze direkt die Membran zu berühren. Es konnte dabei nie das gesamte Probenvolumen verlustfrei wieder abpipettiert werden. Das maximale abpipettierte Volumen betrug 130 µl. Nachdem die Probe von der Membran abgenommen wurde, wurde sie mit TBS-Puffer wieder auf 150 µl aufgefüllt und mit 10 mM EDTA versetzt. Das EDTA diente zum Abstoppen der Reaktion. EDTA ist ein Komplexbildner, der mit zweiwertigen Kationen Chelatkomplexe bildet. Durch das Entziehen der zweiwertigen Kationen wurde die ADAMTS13 inaktiviert. Anschließend wurde die Probe auf 1000 µl mit TBS-Puffer aufgefüllt, der ebenso wie in den anderen Experimenten ein EDTA freier Proteaseinhibitor (Complete, Roche®) enthält. Nachdem das aktivierte Plasma das VWF-Substrat während der Dialyse gespaltet hatte, erfolgte eine Adsorption des VWF an Sepharose-Beads, wie sie bereits beschrieben wurde (Kapitel 3.2.1.2) mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot Analyse (Kapitel 3.2.1.3 und 3.2.1.4). Dazu wurden 1000 µl des verdünnten Aktivierungsgemisches (Plasma-VWF Mischung nach Dialyse gegen 1,5M Harnstoff) zur Adsorption auf die mit Anti-human-VWF-Antikörper gekoppelten Sepharose-Beads gegeben. 30µl CNBr-act. Die CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde zuvor mit einer Mege von 180 µg der anti-human-VWF-Antikörper gekoppelt.

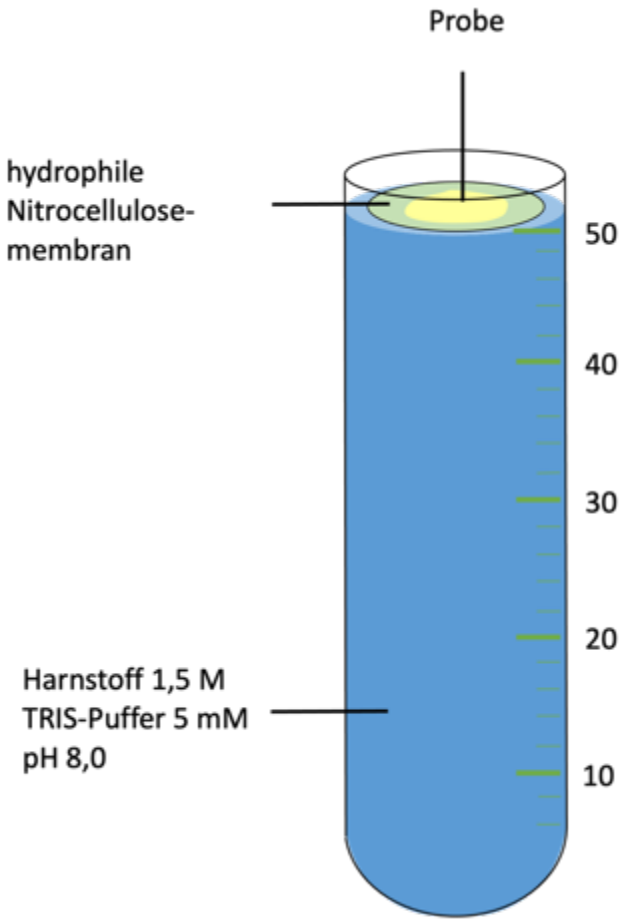

Abbildung 10: Aufbau des Dialyse-Systems

3.2.3 Herstellung von Standards von ungespaltenem und vollständig ADAMTS13-gespaltenem rekombinantem VWF

Zum Herstellen eines Standardpräparates von gespaltenem rekombinanten humanen (rh)VWF wurde ein Ansatz von 33,33 µg/ml rhVWF in Cleavage-Puffer gewählt, der durch eine zweimalige Gabe von 3 µg/ml rhADAMTS13 („truncated“ ADAMTS13) der Firma R&D Systems® gespalten wurde. Shim et al. beschrieben, dass sich der VWF unter Scherkraft entfaltet und damit die ADAMTS13-Spaltstelle zugänglich wird [92]. Daher wurde mit einem Vortexer auf 2500 rpm für 120 Minuten Scheerstess erzeugt, um den VWF zu spalten. Anschließend wurden Aliquots des Ansatzes entnommen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Die SDS-PAGE und die anschließende Western Blot Analyse wurden nach dem in 3.2.2.3 und 3.2.2.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse werden unter 4.1.3.7 dargestellt.

3.2.4 Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin

Um eine möglichst vollständige Spaltung des rhVWF durch Plasmin zu generieren, wurden 29,586 µl rhVWF Stammkonzentration (169 U/ml), 0,721 µl Plasmin Stammkonzentration (1,04 mg/ml) und 1469,7 µl Puffer (TBS-Puffer 150mM NaCl, 0,1% BSA pH 7.4) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 1500 µl. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für 24h inkubiert. Das Aliquotvolumen für SDS-PAGE betrugen jeweils 30 µl. Die SDS-PAGE und die anschließende Western Blot Analyse wurden nach dem in 3.2.2.3 und 3.2.2.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Spätere Experimente (4.1.5.3 und 4.1.5.4) wurden mit einer niedrigeren Plasminkonzentration durchgeführt. Die Ergebnisse werden unter 4.1.5. dargestellt.

3.2.5 VWF:AG-Bestimmung

Die VWF:AG-Bestimmung erfolgte im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Hier wurde die quantitative Bestimmung des VWF:AG mittels eines vollautomatischen Latex-Immunoassay des Herstellers HemosIL® aus Citratplasma durchgeführt. Dazu wurden vom Hersteller Latexpartikel mit polyklonalen Antikörpern beschichtet, die mit dem VWF:AG im Plasma agglutinieren. Bei der Konzentrationsbestimmung des VWF:AG wurde das Prinzip der Turbidimetrie verwendet. Die durch die Agglutination bedingte Lichtdurchlässigkeit wurde bei 405 nm gemessen. Dabei war der Grad der Agglutination proportional zur VWF:AG-Konzentration in der Probe.
Die Plasmaproben wurden vor der VWF:AG-Bestimmung bei -18 Grad eingefroren und gelagert. Vor dem Messen wurden die eingefrorenen Proben 15 Minuten lang bei 37°C aufgetaut. Die Präzisions- und Korrelationsergebnisse wurden im Vorfeld mit spezifischen Reagenzien- und Kontrollchargen ermittelt. Die Ergebnisse des VWF:Ag wurden anschließend in Prozent der Norm angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung zur Anreicherung und Quantifizierung des von-Willebrand-Faktors (VWF) und seiner Spaltprodukte aus humanem Plasma

Um den VWF aus humanem Plasma zu adsorbieren, wurden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Beads polyklonale anti-VWF-Antikörper gebunden. Diese Beads wurden für die Anreicherung des VWF verwendet. Anschließend wurden VWF-Monomere und VWF-Spaltprodukte im reduzierten Zustand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem HRP-gekoppelten polyklonalen anti-VWF Antikörper auf einer PVDF-Membran nach Western Blotting mittels Chemilumineszenz detektiert und analysiert.

4.1.1 Untersuchung der bestmöglichen Konditionen zur Anreicherung von VWF aus humanem Plasma

4.1.1.1 Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelte polyklonale anti-VWF-Antikörper

An die CNBr-aktivierten Sepharose-Beads wurden unterschiedliche Mengen eines polyklonalen Kaninchen anti-human von-Willebrand-Faktor Antikörpers (RaVWFab) gebunden. Anschließend wurde mit 1000 µl eines mit TBS-Puffer 1:4 verdünnten Plasma eines gesunden Kontrollspenders eine Adsorption des VWF aus dem Plasma an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B durchgeführt. Nach der ersten Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden der Ansatz bei 15000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit dem Überstand wurde eine zweite Adsorption für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben der ersten Adsorption wurden zusammen mit denen der zweiten Adsorption auf ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum einen wurden die aufgetrennten Proteine im SDS-PAGE Gel mittels Silberfärbung angefärbt und zum anderen mit einem 2. SDS-PAGE Gel wurde der VWF mittels Western Blot Analyse detektiert. Insgesamt konnten pro Spur 30 µl CNBr-

aktivierte Sepharose 4B aufgetragen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Im Silber gefärbten Polyacrylamidgel wurden unterschiedliche Banden detektiert, welche auf diverse Plasmaproteine hindeuten. Das Monomer des VWF beträgt 250 kDa, während das N-terminale Spaltprodukt beim durch ADAMTS13 gespaltenen VWF 140 kDa und das C-terminale Spaltprodukt 176 kDa beträgt [115]. Anhand des mitgeführten Markers konnte man sowohl im Bereich von 250 kDa, also auch im Bereich von 140 kDa und 176 kDa Banden erkennen. Zur genaueren Verifizierung, dass es sich um den VWF und seine ADAMTS13-abhängigen Spaltprodukte handelt, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dieser wurde mit einem primären HRP-gekoppelten Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörpers mittels Chemiluminiszenz entwickelt. Eine genaue Erläuterung zu den Innhalten der einzelnen Spuren für die Abbildungen 11, 12 und 13 ist in Tabelle 10 aufgeführt.

In Abbildung 12 ist bei niedriger Expositionszeit des Blots eine Bande bei 250 kDa zu erkennen, die VWF-Monomere im reduzierten Zustand darstellt. Erst nachdem die Expositionszeit auf bis zu 80 Minuten verlängert wurde (Abbildung 13AB), konnte man eine Bande bei 176 kDa und bei 140 kDa erkennen, die entsprechenden Spaltprodukte des VWF erkennen lassen. Die mitgeführten BSA-Proben in Spur 4 und 8 wurden als Negativkontrollen erwartungsgemäß nicht durch den anti-VWF Antikörper detektiert und angefärbt. Diese Negativkontrolle diente zum Nachweis von unspezifischen Reaktionen des primären HRP-gekoppelten Antikörpers. Die Immunadsorption konnte den VWF aus humanem 1:4 verdünntem Plasma extrahieren und anreichern. Anschließend konnte der VWF sowie seine Spaltprodukte mittels Western Blot Analyse detektiert werden.

Tabelle 10: Konzentration und Menge von RaVWFabzu Abbildung 12, 13 und 14

	Erste Adsorption			
Spur	1	2	3	4
	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	BSA-Kontrolle
Menge des an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen PRahVWFAK	15,6 µg anti-VWF-AK	31 µg anti-VWF-AK	62,5 µg anti-VWF-AK	62,5 µg BSA
	Zweite Adsorption			
Spur	5	6	7	8
	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	BSA-Kontrolle
Menge des an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen PRahVWFAK	15,6 µg anti-VWF-AK	31 µg anti-VWF-AK	62,5 µg anti-VWF-AK	62,5 µg BSA

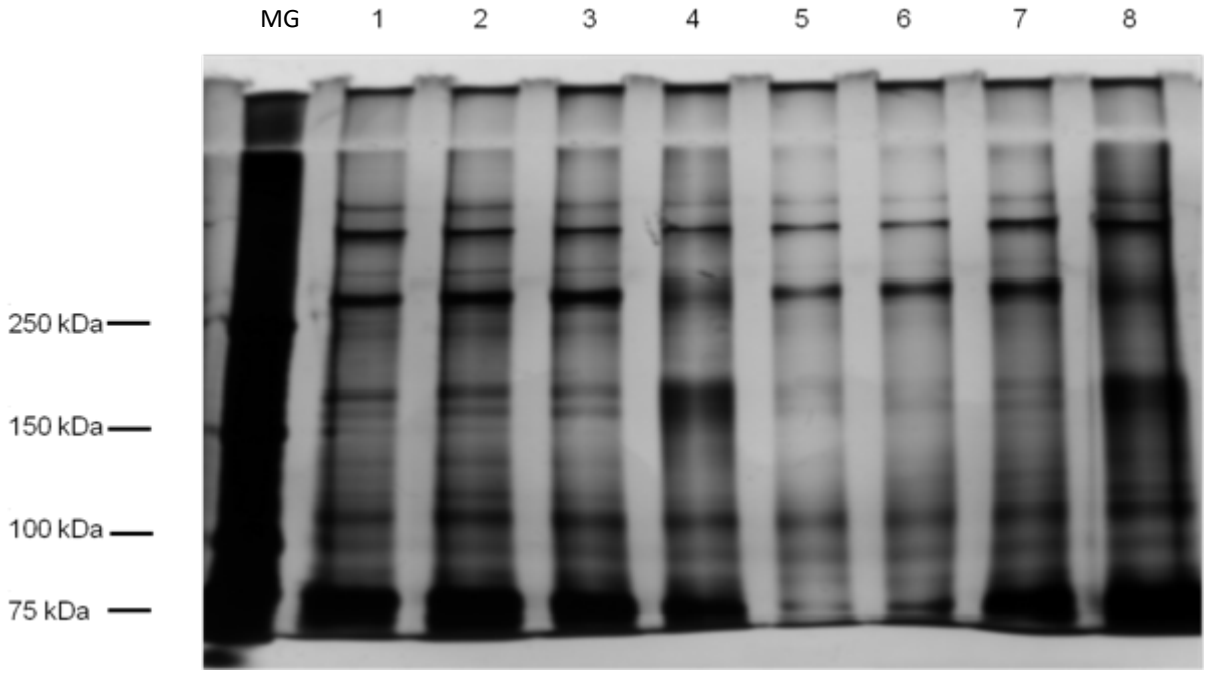

Abbildung 11: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit Silberfärbung, 5% Polyacrylamidgel, Silberfärbung; ganz links Markerbande (MG)

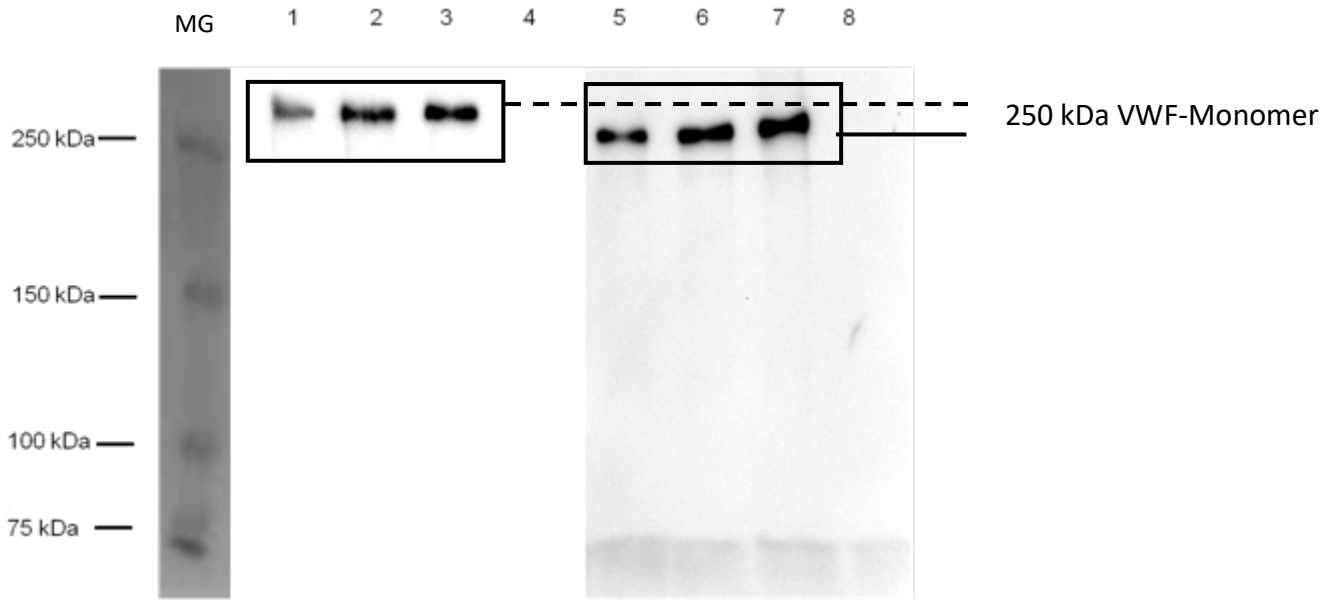

Abbildung 12: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Detektion mit primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper und niedriger Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit Spur 1 bis 4:10s., Expositionszeit Spur 5 bis 8: 60 Sekunden (s).

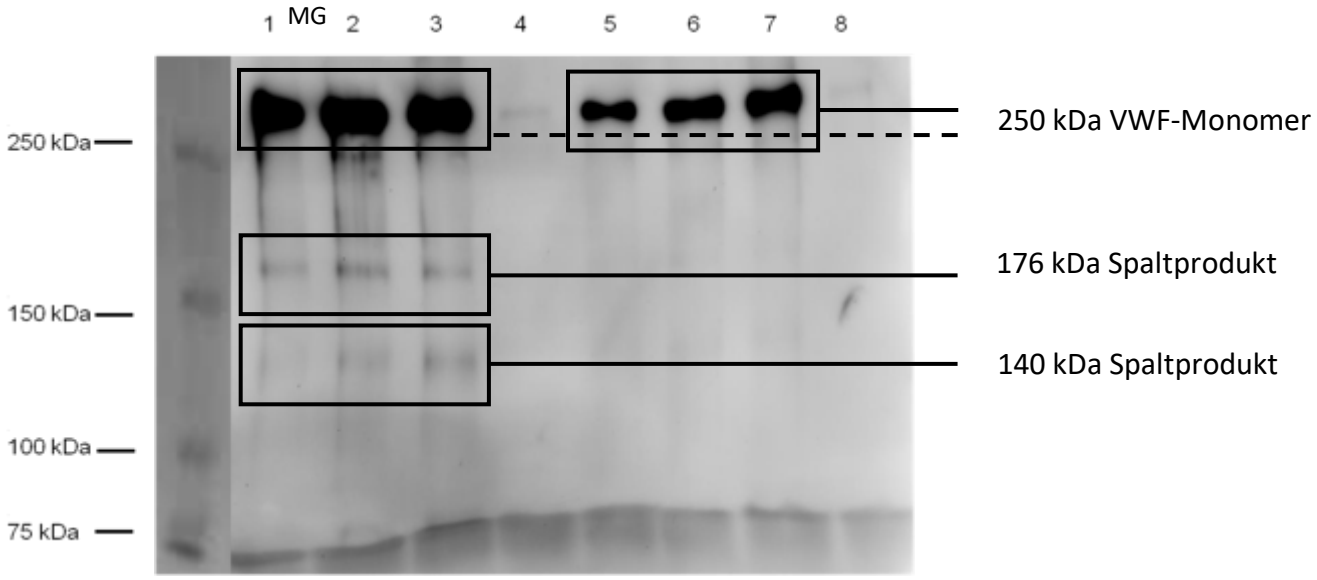

Abbildung 13: Erste und zweite Adsorption von humanem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Detektion mit primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper und hoher Expositionszeit 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 80 min

4.1.1.2 Ermittlung der optimalen Kopplungsmenge an Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper an Sepharose-Beads

Um eine möglichst große Menge des VWFs aus dem humanen Plasma zu extrahieren, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt: Das Ziel war es, eine geeignete Menge an Kaninchen-anti-human-VWF-Antikörper zu ermitteln, um eine maximale Adsorption des VWF aus dem Plasma an den CNBr-aktivierten Sepharose 4B-Beads zu gewährleisten. Da in eine Tasche eines Western Blot-Gels maximal 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B passten, wurden die nachfolgenden Kalkulationen in Bezug auf die Menge des anti-VWF-AKs für 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B berechnet. Des Weiteren wurde als Negativkontrolle fortan kein BSA mehr eingesetzt, sondern eine IgG-Kontrolle. Dies diente zum Ausschluss, dass der VWF unspezifisch an IgG bindet. Die Konzentration des an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelten Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörpers wurde erhöht, um noch mehr VWF aus dem Plasma zu adsorbieren. Es erfolgte eine Immunadsorption mit einem 1:4 verdünnten Plasma eines gesunden Kontrollspenders. Nach der Inkubation wurde der Überstand gewonnen und aus dem Überstand wurde der im Plasma verbleibende VWF im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz bestimmt (siehe 3.2.5).

Die abnehmende Konzentration des VWF-Gehalts im Überstand (Tabelle 12) bei steigender RaVWFab-Menge auf der CNBr-aktivierten Sepharose 4B zeigte, dass eine höhere Menge an RaVWFab zu einer vermehrten Adsorption von VWF aus dem Probanden-Plasma führt. Dieses Ergebnis wurde im Western Blot (Abbildung 14) bestätigt. Man erkennt anhand der Bandendicke, dass sowohl mehr vom VWF-Monomer als auch von VWF-Spaltprodukten absorbiert wurden. Im Plasma eines gesunden Probanden erwarteten wir nur kleine Mengen der VWF-Spaltprodukte zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt konnte allerdings noch keine Quantifizierung der Signalstärke durchgeführt werden. Ausgehend von einer Konzentration von etwa 10 µg/ml VWF im menschlichen Blutplasma, was 100% VWF:Ag entspricht, konnten die durch die CNBr-aktivierte Sepharose 4B adsorbierten Mengen von VWF errechnet werden [116].

Tabelle 11: Konzentration und Menge von RaVWFab zu Abbildung 14

Spur	1	2	3	4	5	6
	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	Plasma-Adsorption	IgG-Kontrolle
Konzentration des RaVWFab während der Kopplung an CNBr-Sepharose	0,12 mg/ml	0,24 mg/ml	0,48 mg/ml	0,96 mg/ml	1,44 mg/ml	1,44 mg/ml
Menge des an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen RaVWFab	15 µg	30 µg	60 µg	120 µg	180 µg	180 µg IgG

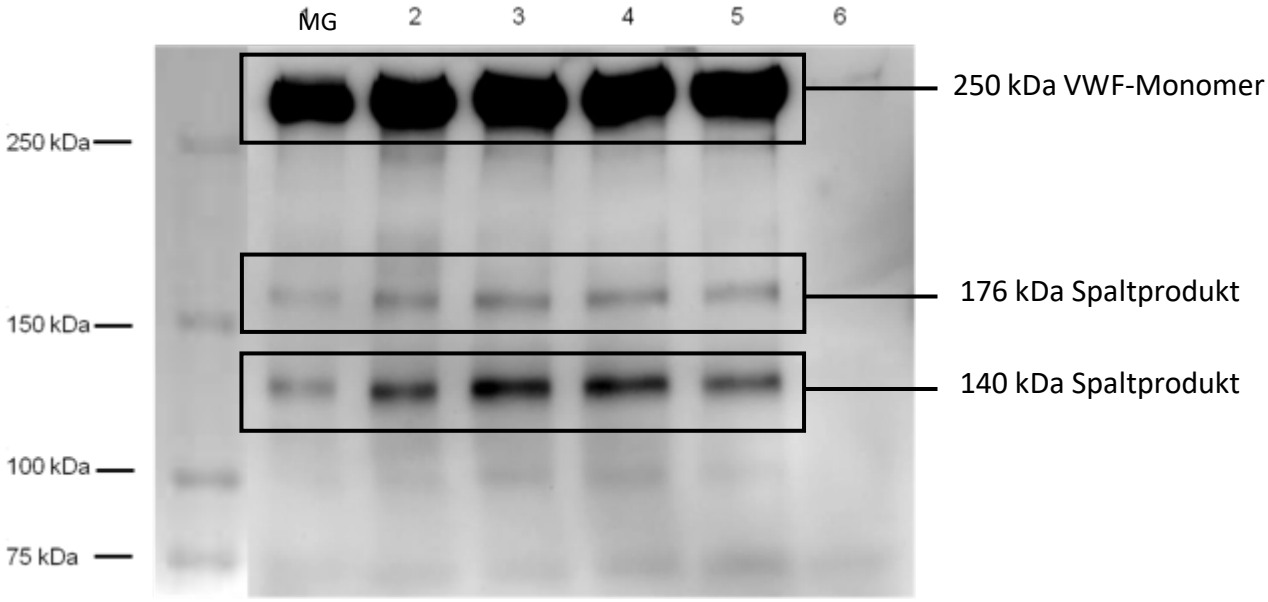

Abbildung 14: Dosisermittlung der auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit aufsteigender Konzentration von RaVWFab, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x8 min

Tabelle 12: Bestimmung des VWF-Gehaltes aus den Überstanden nach Adsorption des VWF an die Sepharose-Beads zu Abbildung 14

Plasma	VWF-Gehalt im Überstand (%)	Errechnete Adsorption ann CNBr-Sepharose Beads in µg
Probanden-Plasma unverdünnt	114	-
1:4 verdünntes Probanden- Plasma	28	-
Probe 1 (0,12 mg/ml PRahVWFAK)	18	0,38
Probe 2 (0,24 mg/ml PRahVWFAK)	16,6	0,45
Probe 3 (0,48 mg/ml PRahVWFAK)	12,7	0,645
Probe 4 (0,96 mg/ml PRahVWFAK)	9,6	0,8
Probe 5 (1,44 mg/ml PRahVWFAK)	8,1	0,875
Probe 6 (1,44 mg/ml IgG)	25,6	-

4.1.1.3 Dosisermittlung des zu offerierenden VWF in humanem Plasma an eine definierte Menge mit polyklonalem anti-VWF-Antikörper beladener CNBr-aktivierte Sepharose 4B

30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit unterschiedlichen Mengen an gebundenem RaVWFab wurden einmal 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma (Abbildung 15) und einmal mit 500 µl 1:6 verdünntem Probandenplasma inkubiert (Abbildung 16). Ziel war es herauszufinden, ob es einen Unterschied gibt, wenn die Menge an offeriertem VWF im Plasma verändert wird. Die Überstände nach der Adsorption wurden gewonnen und anschließend wurde der VWF-Gehalt (%) im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz bestimmt. Die ermittelten Daten des VWF-Gehaltes in den Überständen sind in Tabelle 13 aufgelistet. Dabei zeigte sich eine höhere Adsorption an dem VWF-Monomer und den VWF-Spaltprodukten im Western Blot bei 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma als bei 500 µl mit einem 1:6 verdünnntem Plasma. Daher wählten wir für die nachfolgenden Versuche fortan die Plasmen 1:4 zu verdünnen und eine Adsorption, wenn möglich, mit 1000 µl durchzuführen. Die errechnete Adsorption aus dem Probandenplasma zeigte ebenfalls, dass eine Immunadsorption mit 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma eine deutlich höhere VWF-Adsorption an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B zur Folge hatte als eine Immunadsorption mit 500 µl 1:6 verdünntem Probandenplasma. Bei den nachfolgenden Versuchen wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Adsorption mit 1000 µl 1:4 verdünntem Plasma durchgeführt.

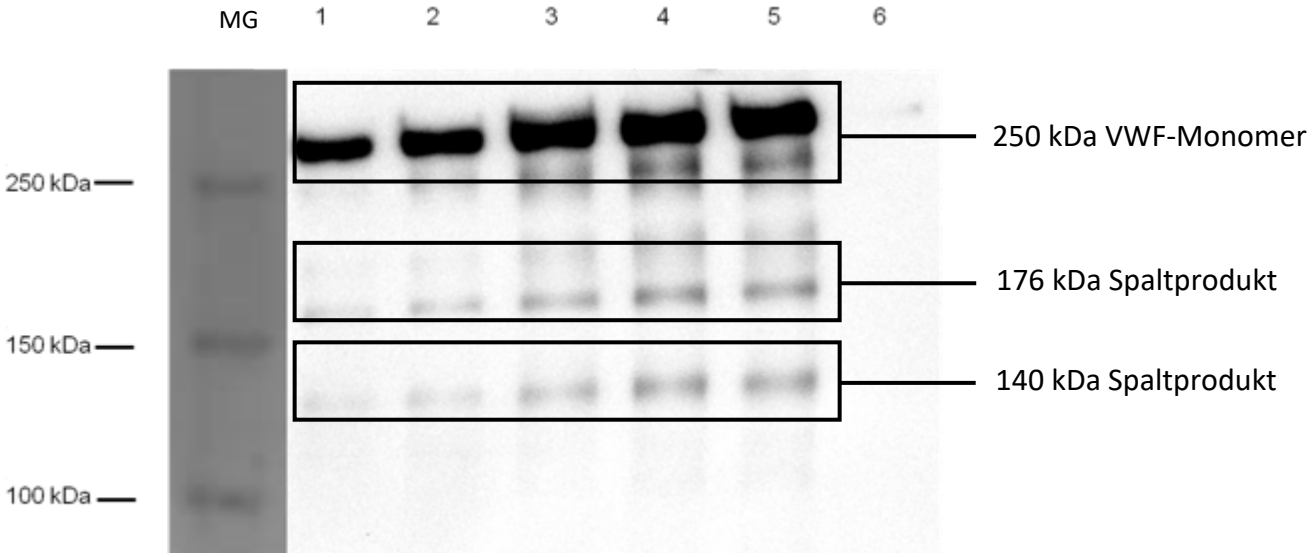

Abbildung 15: Dosisermittlung des auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit 1000µl 1:4 verdünntem Plasma, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5s.

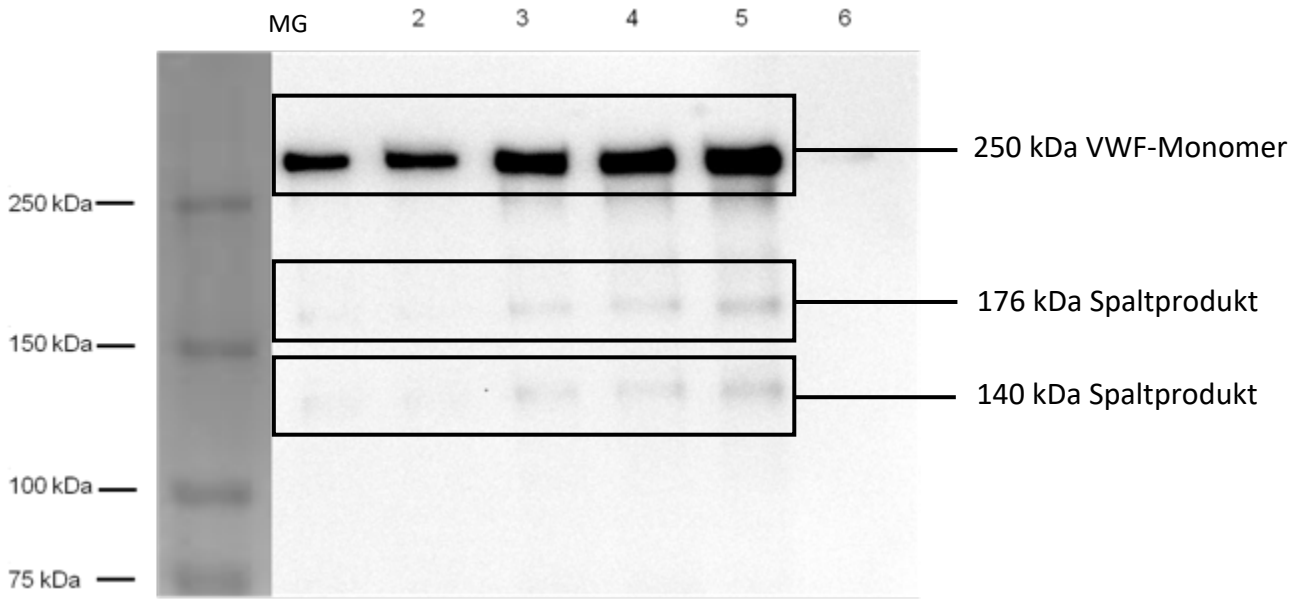

Abbildung 16: Dosisermittlung des auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebundenen polyklonalen anti-VWF-Antikörpern mit 500µl 1:6 verdünntem Plasma, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5s.

Tabelle 13: Ergebnisse des VWF-Gehaltes aus den Überstanden von Abbildung 15 und 16 und der errechneten Adsorption des VWF in µg

Plasma	VWF-Gehalt (%)	Errechnete Adsorption in (µg)	VWF-Gehalt (%)	Errechnete Adsorption in (µg)
	Adsorption aus 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma		Adsorption mit 500 µl 1:6 verdünntem Probandenplasma	
Probanden-Plasma unverdünnt	112,5	-	112,5	-
1:4 und 1:6 verdünntes Probanden- Plasma	28,2	-	19,2	-
Probe 1 (0,12 mg/ml RaVWFab)	23,3	0,4	13	0,235
Probe 2 (0,24 mg/ml RaVWFab)	21,2	0,61	10,2	0,375
Probe 3 (0,48 mg/ml RaVWFab)	19,1	0,82	8,1	0,48
Probe 4 (0,96 mg/ml RaVWFab)	17,3	0,94	6,1	0,58
Probe 5 (1,44 mg/ml RaVWFab)	14,7	1,26	4,1	0,68
Probe 6 (1,44 mg/ml Ig)	27,3	-	17,7	-

4.1.1.4 Quantitative Auswertung der Pixeldichte von VWF-Banden im Western Blot

Von drei verschiedenen Probanden wurden Bead-Adsorptionen des VWF aus Plasma durchgeführt. Dabei war das Ziel, sowohl das VWF-Monomer, als auch die VWF-Spaltprodukte quantitativ zu erfassen. Dazu wurden 1000 µl 1:4 verdünntes Probandenplasma nach bekanntem Protokoll an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B adsorbiert.

Proband A:

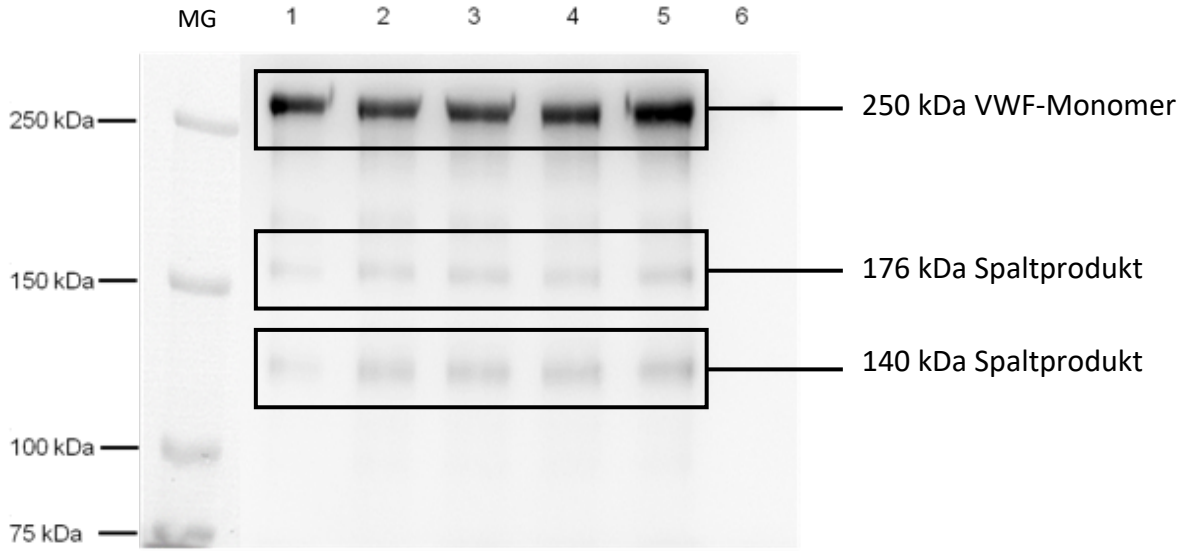

Abbildung 17: Western Blot Proband A, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,0 s.

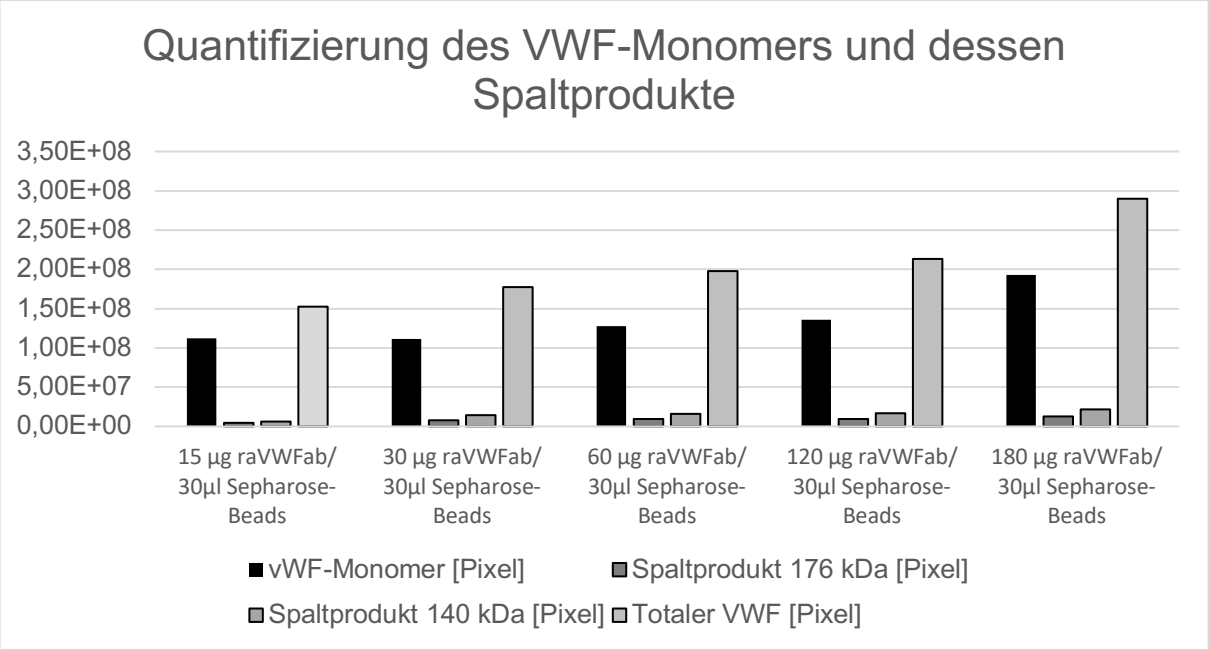

Abbildung 18: Quantitative Erfassung der Pixeldichte von VWF-Banden im Western Blot (Proband A)

Proband B:

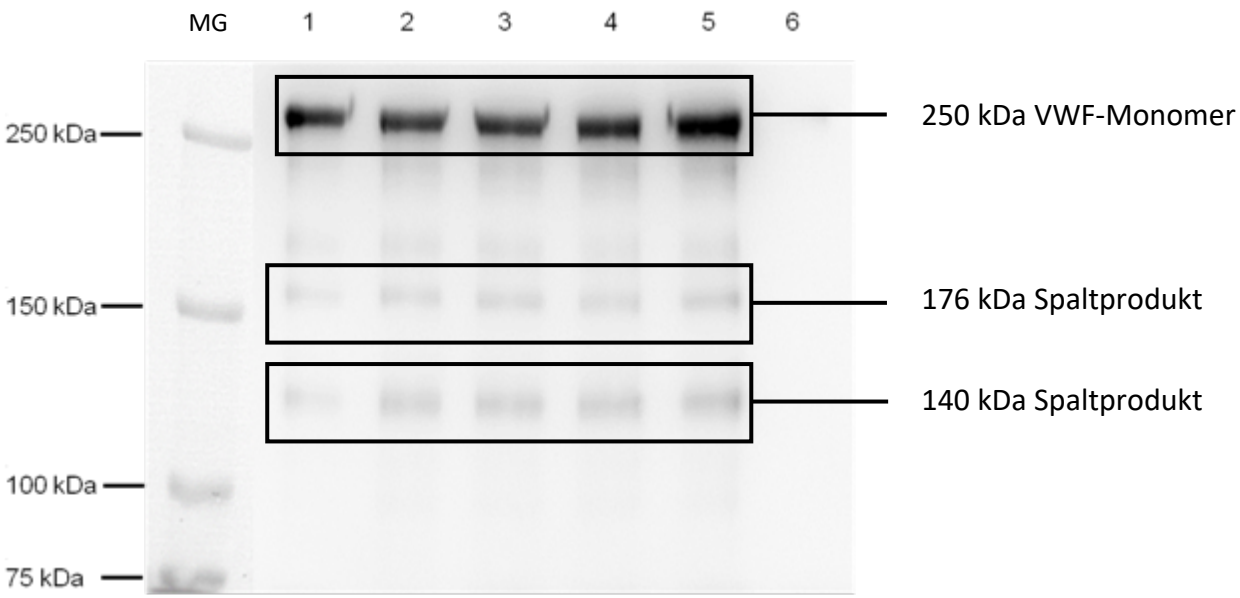

Abbildung 19: Western Blot Proband B, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 6,6 s.

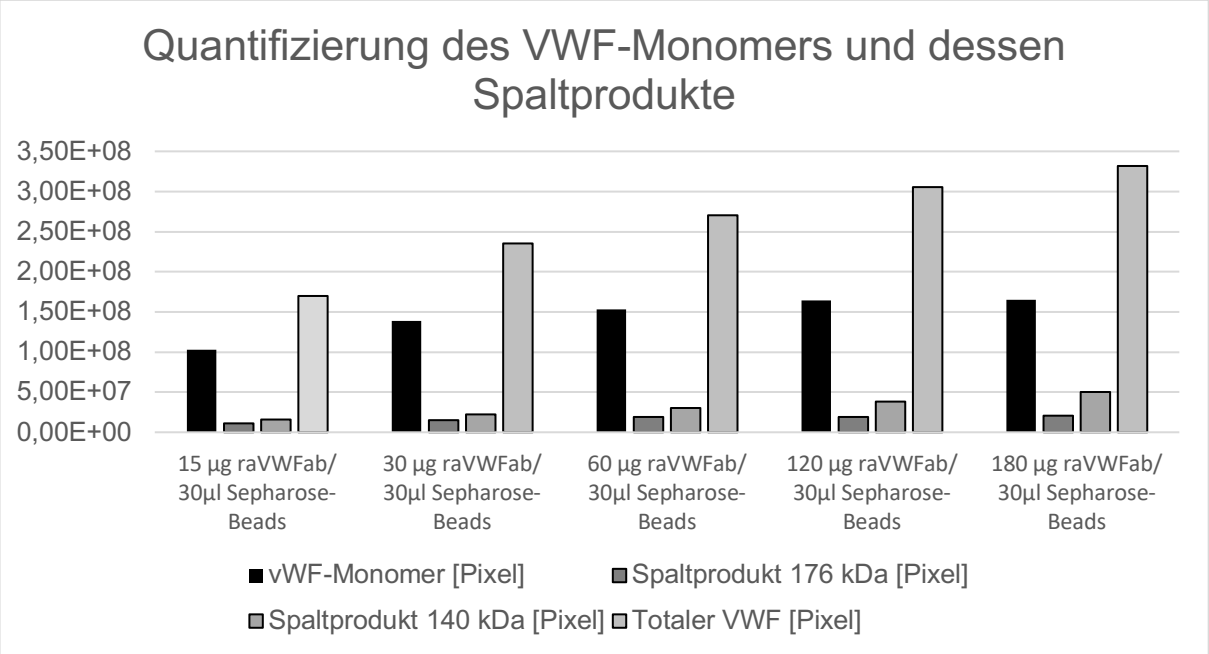

Abbildung 20: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B als Säulendiagramm

Proband C:

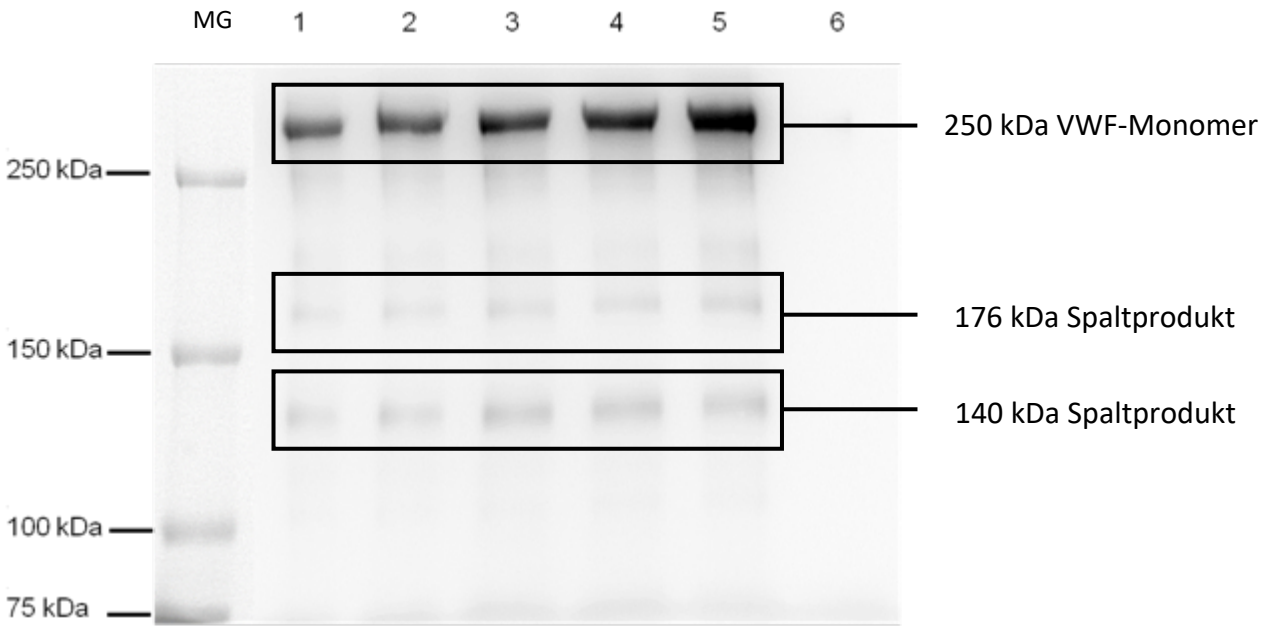

Abbildung 21: Western Blot Proband C, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5,5s.

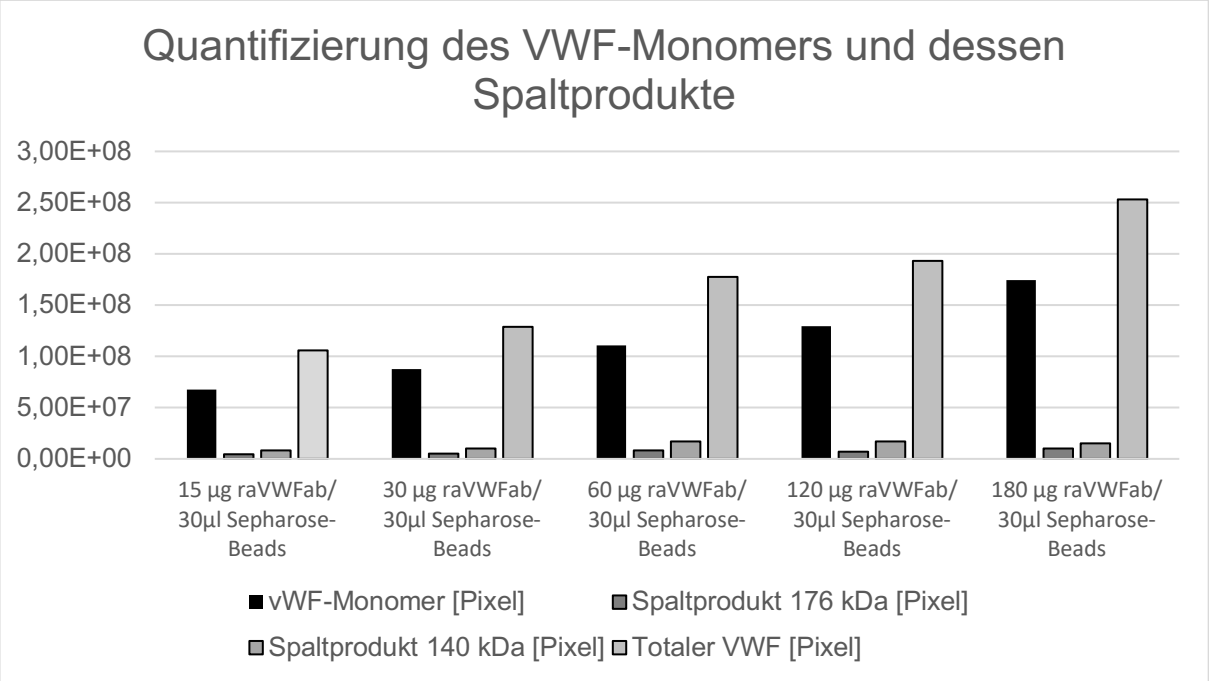

Abbildung 22: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C als Säulendiagramm

In allen drei Probandenplasmen konnte mit steigender RaVWFab-Menge auf der CNBr-aktivierten Sepharose 4B eine vermehrte Adsorption des VWF-Monomers und seiner Spaltprodukte nachgewiesen werden. Dies zeigt sich sowohl qualitativ auf dem Western Blot in den Abbildungen 17, 19 und 21 durch eine Intensitätszunahme der

Banden bei 250 kDa, 176 kDa und 140 kDa, als auch durch eine quantitative Bestimmung der Pixel der Banden in den Abbildungen 18, 20 und 22.

Tabelle 14: Ergebnisse des VWF-Gehaltes aus den Überstanden von den Probanden A, B und C und der errechneten Adsorption des VWF in µg

	VWF:AG im Überstand (%)			Errechnete Adsorption des VWF (µg)		
	Proband A	Proband B	Proband C	Proband A	Proband B	Proband C
15µg RaVWFab / 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B	13,8	16,5	8,6	0,55	0,28	1,07
30µg RaVWFab / 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B	14,3	13,3	9	0,5	0,6	1,03
60µg RaVWFab / 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B	13,7g	12,1	6,4	0,56	0,68	1,29
120µg RaVWFab / 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B	12,1	12,5	5,9	0,72	0,72	1,34
180µg RaVWFab / 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B	15,4	11,8	3,7	0,39	0,75	1,56
180µg IgG-Kontrolle	19,3	19,3	19,3			

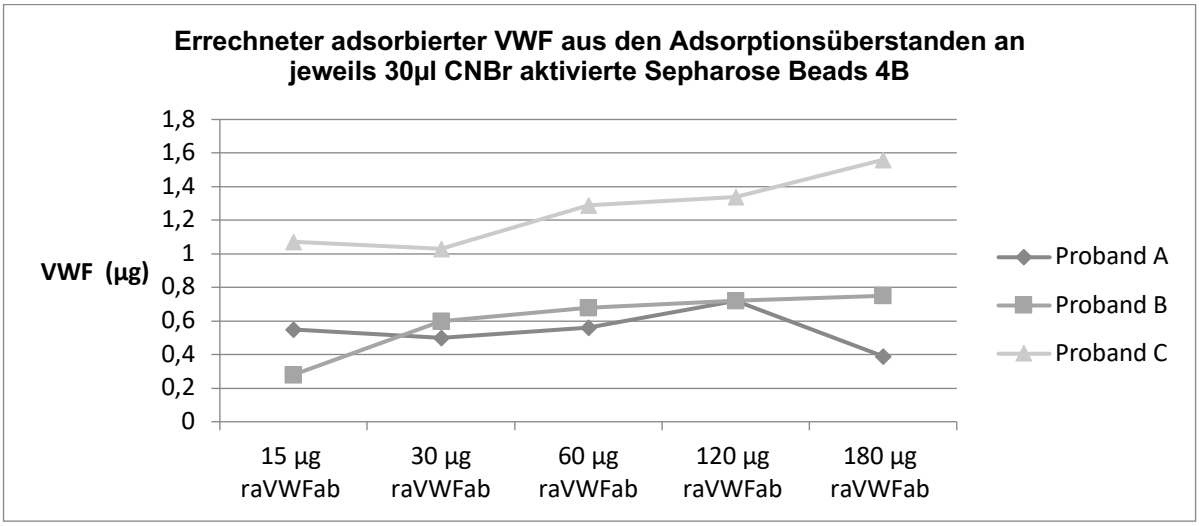

Abbildung 23: Abbildung 24: Errechneter adsorbierter VWF aus den Adsorptionsüberstanden an jeweils 30µl CNBr aktivierte Sepharose Beads 4B aus den Adsorptionsüberständen der Probanden A, B und C

Die in den Überständen gemessenen und später errechneten Konzentrationen aus Tabelle 14 zeigen in Abbildung 23 im Trend eine Zunahme der Adsorption des VWF. Allerdings zeigt sich eine deutliche Abnahme des bei Proband A errechneten Wertes aus dem gemessenen VWF:AG bei 180µg RaVWFab/30µl CNBr-aktivierter Sepharose 4B. Aus der Auswertung der Pixeldichte im Western Blot geht hervor, dass es auch bei diesem Probanden zu einer Zunahme der Adsoprtion bei 180 µg RaVWFab kam. Man kann daher am ehesten von einem Fehler bei der Bestimmung des VWF:AG aus dem Überstand ausgehen.

4.1.2 Untersuchung zur Intensität der Absorption von VWF-Spaltprodukten bei verstärkter Spaltung des VWF

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Adsorption mit auf Sepharose-Beads gebundenem RaVWFab der VWF aus dem Plasma adsorbiert und damit angereichert wird. Die nachfolgenden Experimente sollten sicherstellen, dass bei einer verstärkten ADAMTS13-vermittelten proteolytischen Spaltung des VWF die resultierenden kleineren, partiell gespaltenen VWF-Multimere gleichermaßen adsorbiert werden, wie die größeren, nicht gespaltenen VWF-Multimere. Dazu wurde sowohl humaner, gereinigter VWF aus dem Plasma (Willfact®) als auch rekombinanter VWF, mit humanem Plasma, in dem physiologisch die ADAMTS13 aktiviert wurde, gespalten. Um zu verhindern, dass andere Proteasen den VWF spalten, wurde zusätzlich Pefabloc® in den Ansatz gegeben. Dieser Proteaseinhibitor blockiert alle Proteasen, außer Metalloproteasen. Nach Inkubation in einem Dialysesystem, welches unter 3.2.2 beschrieben wurde, wurden die Proben entnommen und es wurde ein Western Blot durchgeführt.

4.1.2.1 Proteolytische Spaltung von gereinigtem denaturiertem humanem VWF-Konzentrat mittels ADAMTS13 im Normalplasma im zeitlichen Verlauf

Aus den Plasmaproben der Spuren A1-A5 wurde im Anschluss an die Dialyse eine Sepharose-Bead-Adsorption durchgeführt. Aus den Plasmaproben der Spuren B1-B5 wurden nach der Dialyse keine Sepharose-Bead Adsorption. Beide Probenreihen wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Der dazugehörige Western Blot ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Probenverteilung des Wetsern Blots von Abbildung 24 wird in Tabelle 15 gezeigt. Anhand dieser ersten Ergebnisse wurde beobachtet, dass es bei einer längeren proteolytischen Spaltung mittels plasmatischer ADAMTS13 zu einer Zunahme der Spaltprodukte kommt, sowie zu einer Abnahme des VWF-Monomers nach reduzierter SDS-PAGE. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei einer verstärkten VWF-Spaltung mittels ADAMTS13 auch die VWF-Spaltprodukte von der CNBr-aktivierten Sepharose 4B adsorbiert werden.

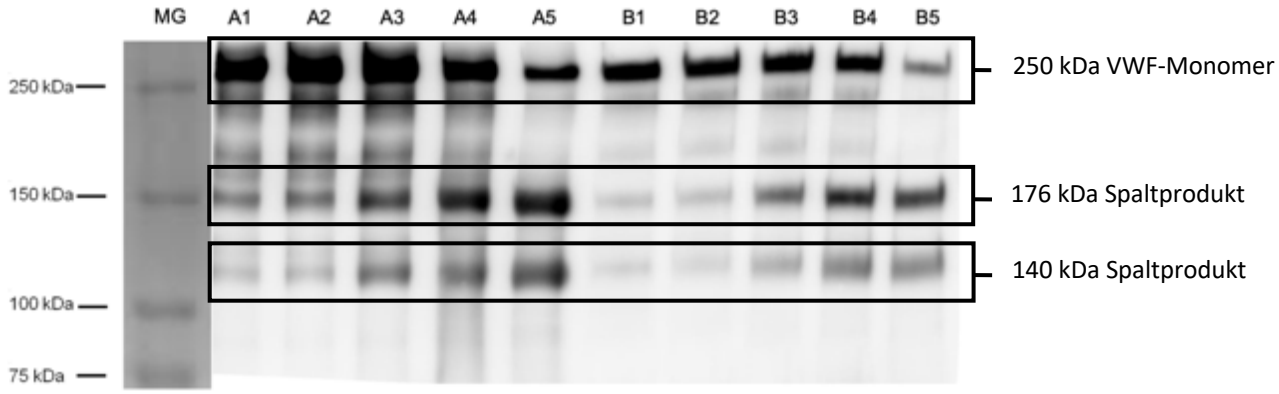

Abbildung 24: Proteolytische Spaltung von Willfact mittels ADAMTS13 aus Normalplasma im zeitlichen Verlauf, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s.

Tabelle 15: Konditionen der proteolytischen VWF-Spaltung von Abbildung 25

Spur	A1	A2	A3	A4	A5
Plasma Verdünnung	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Dauer der Dialyse gegen 1,5 M Urea, 0,05 M Tris, pH 8,0 (h)	0	1	3	6	24
	Adsorption an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B				
Spur	B1	B2	B3	B4	B5
Plasma Verdünnung	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Dauer der Dialyse (h)	0	1	3	6	24
	Keine Adsorption an CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Probe wurde direkt aufgetragen				

4.1.2.2 Quantitative Auswertung der Pixeldichte von mittels plasmatischer ADAMTS13 gespaltenem VWF mit und ohne Adsorption an Sepharose-Beads

Die Versuche unter 4.1.2.1 wurden noch einmal mit drei verschiedenen Plasmen von Probanden durchgeführt und zusätzlich densitometrisch ausgewertet. Exemplarisch wurde nur von Proband C der Western Blot in Abbildung 25 mit aufgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Probanden A, B und C sind in den Abbildungen 26 bis 31 dargestellt. Bei allen drei Probanden zeigte sich eine Abnahme des 250 kDa Monomers sowie eine Zunahme der VWF-Spaltprodukte über die Zeit. Eine Ausnahme dabei bildet Proband C nach 24h Dialyse. Dort zeigte sich, dass die Pixeldichte des 140 kDa VWF-Spaltprodukts nicht wie in den anderen Probandenproben anstieg, sondern sogar abfiel. Es ist davon auszugehen, dass an dieser Stelle die Bloteffizienz nicht optimal war (siehe Abbildung 25). Die Versuche zeigten, dass je mehr

Spaltprodukte im Plasma vorhanden waren, diese auch von der CNBr-aktivierten Sepharose 4B adsorbiert wurden.

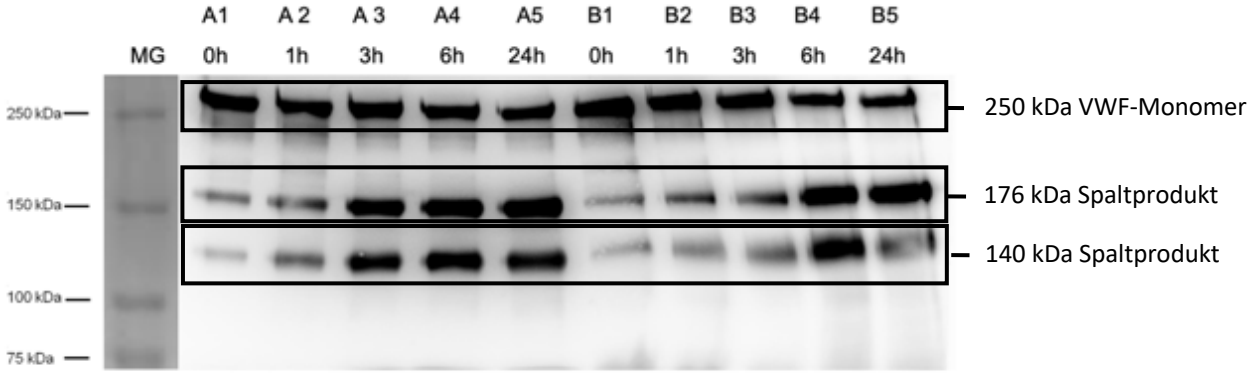

Abbildung 25: VWF gespalten mit plasmatischer ADAMTS13 während der Dialyse gegen 1, 5M Urea, 0,0 5M Tris bei pPH 8,0 von Proband C – A1-A5 mit Adsorption, B1-B5 ohne Adsorption, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s.

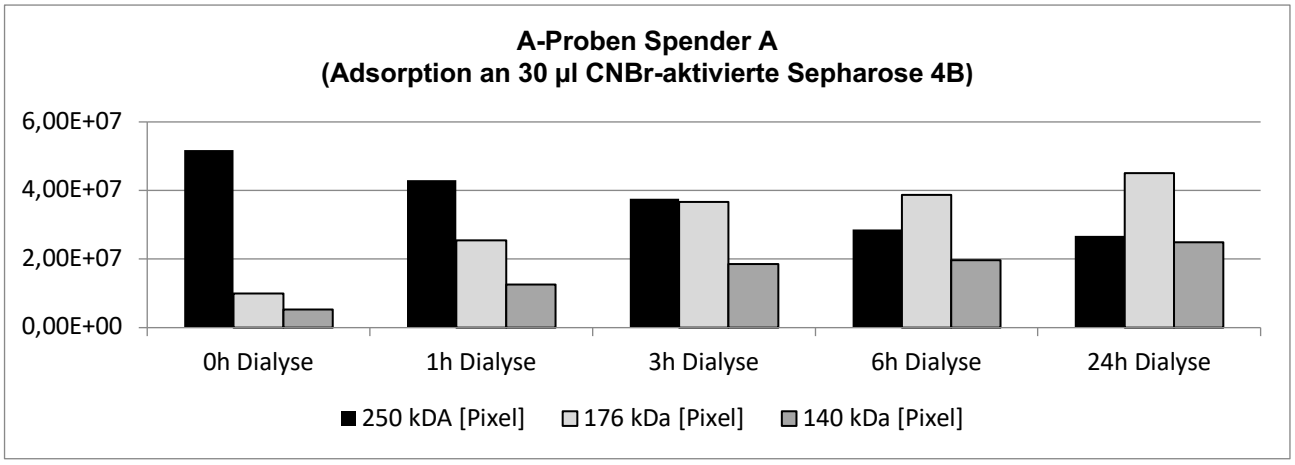

Abbildung 26: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband A der A-Proben

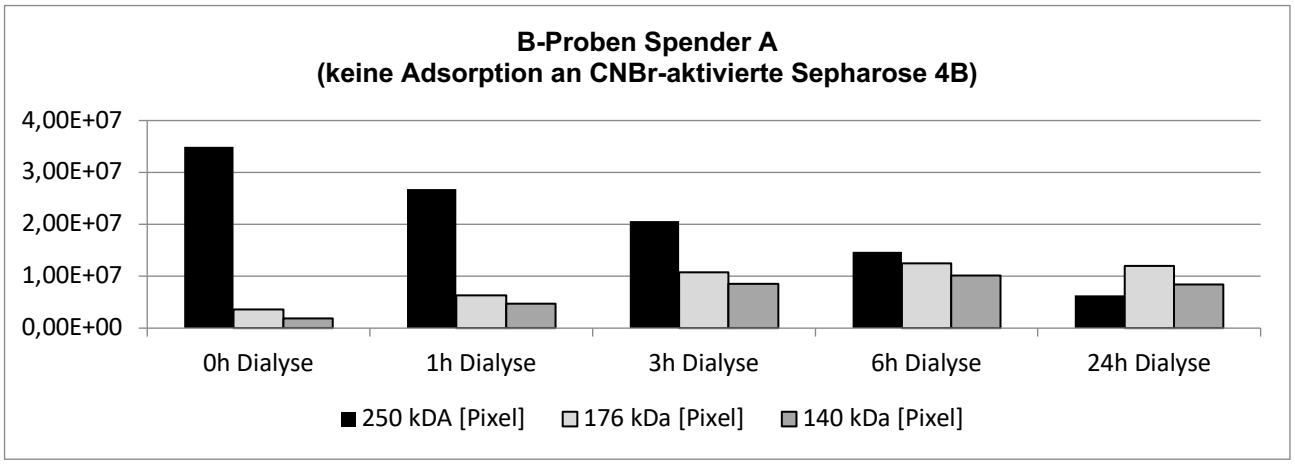

Abbildung 27: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband A der B-Proben

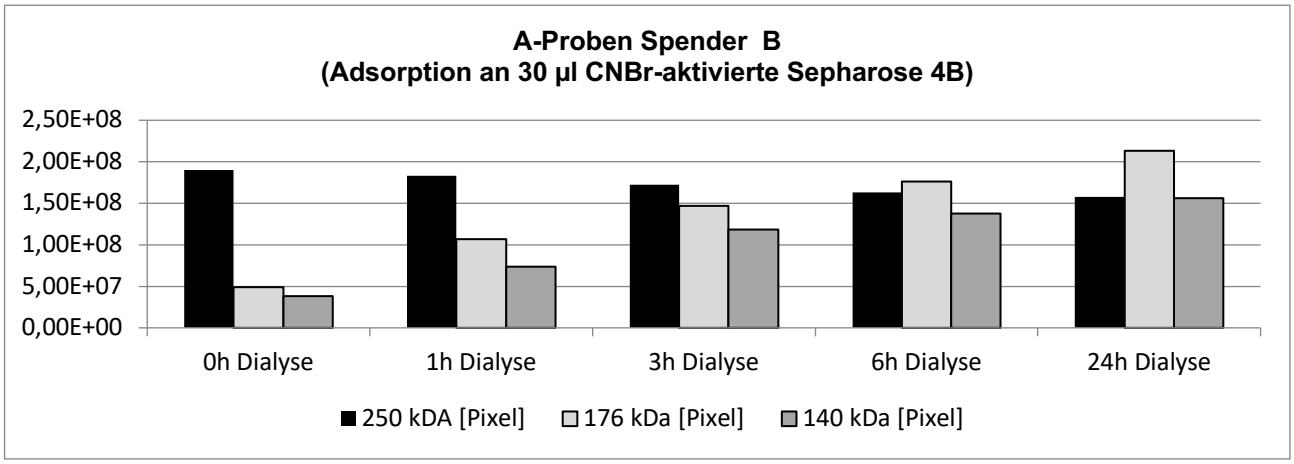

Abbildung 28: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B der A-Proben

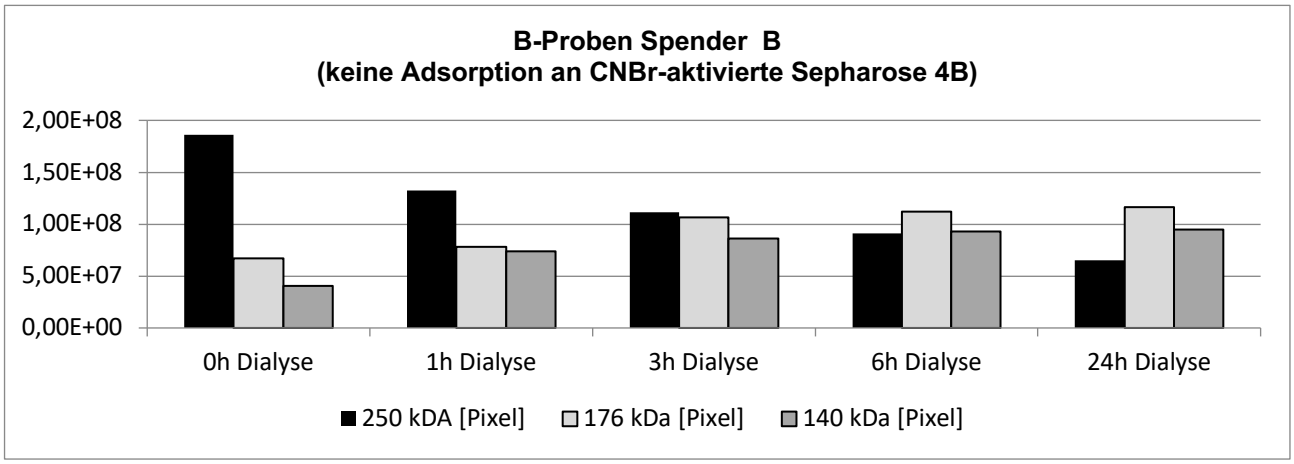

Abbildung 29: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband B der B-Proben

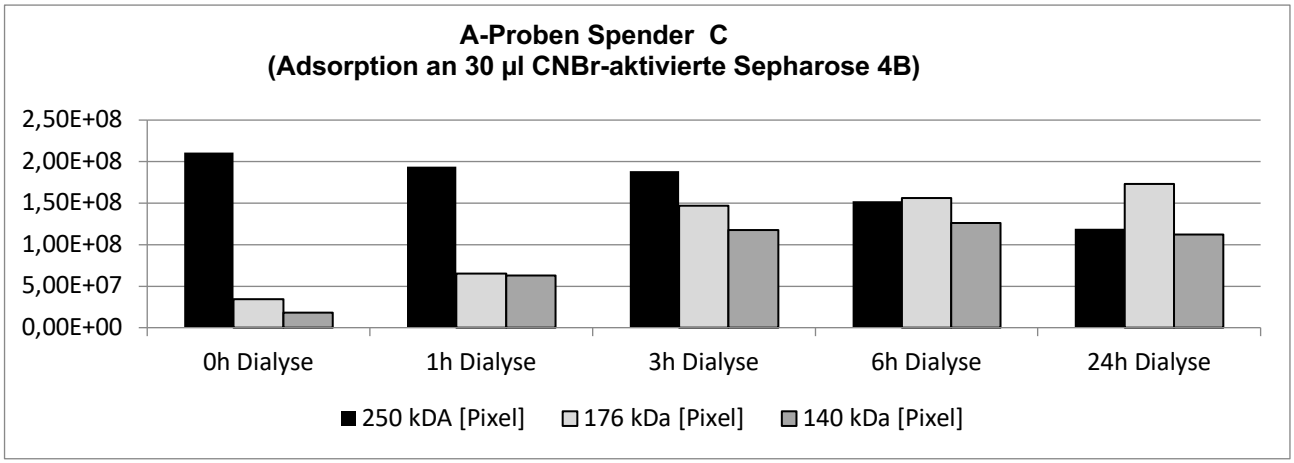

Abbildung 30: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C der A-Proben

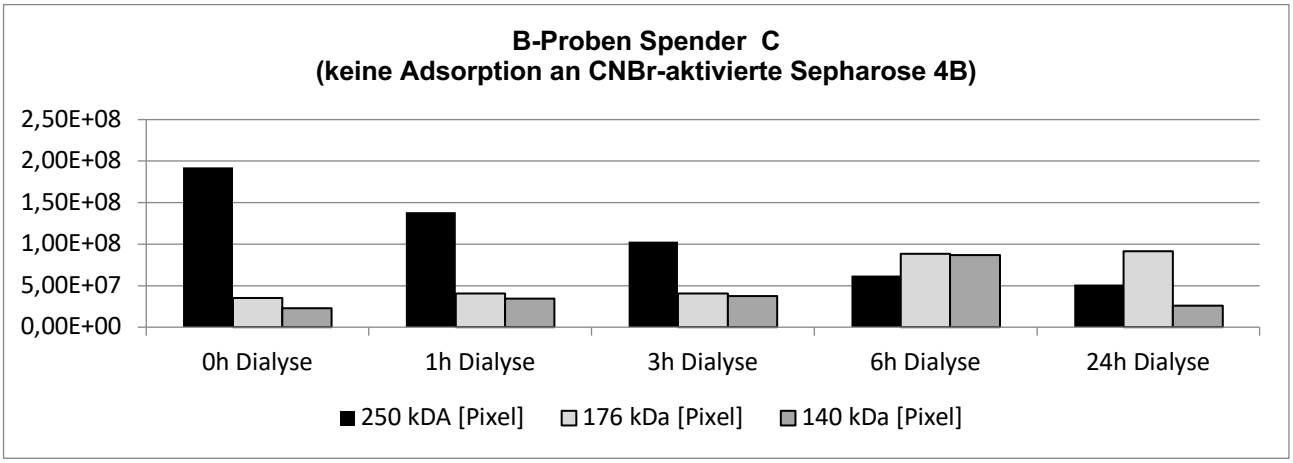

Abbildung 31: Quantitative Erfassung der Pixeldichte Proband C der B-Proben

4.1.2.3 Erste quantitative Messungen der Pixeldichte des VWF

Mit dem Western Blot Verfahren ist eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von VWF-Spaltprodukten möglich. Um eine quantitative Aussage über die Menge des vorhandenen intakten VWF-Monomers und seiner 176kD- und 140kD-Fragmente zu machen, wurde eine quantitative Erfassung der Pixeldichte mittels Densitometrie durchgeführt.

In einem Western Blot wurden 1 µg Willfact® vier Mal aufgetragen und die Pixeldichte wurde densitometrisch bestimmt. Abbildung 32 zeigt den dazu durchgeführten Western Blot. In Abbildung 33 ist die dazugehörige densitometrische Auswertung der Pixeldichte der Spuren 1-4 dargestellt. In Tabelle 16 sind die numerischen Messergebnisse von Abbildung 33 aufgelistet. Die ersten quantitativen Ergebnisse zeigten, dass man Willfact® gut detektieren kann und, dass bei exaktem Arbeiten eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich ist, was die Standardabweichung der Pixeldichte von 1,41% zeigt.

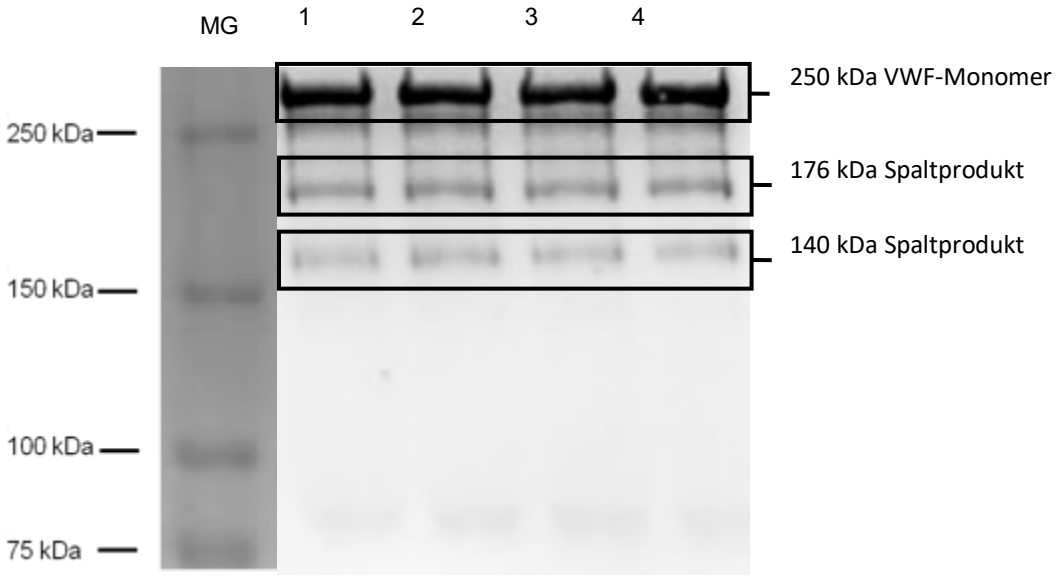

Abbildung 32: Quantivative Erfassung der Pixeldichte mit 1µg Willfact® pro Spur, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3x2s. n=4 (technische Replikate)

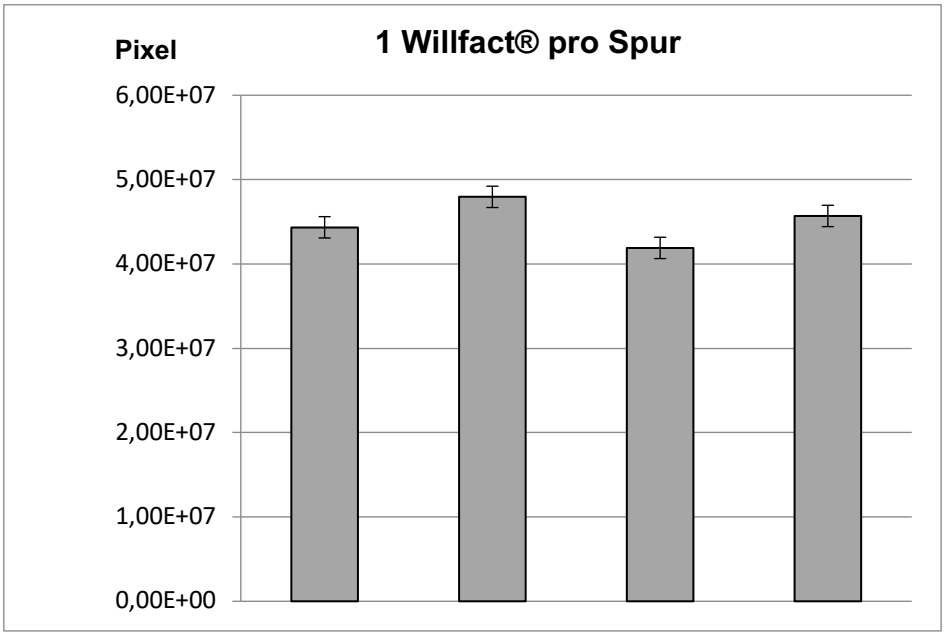

Abbildung 33: Auswertung der quantitativen Erfassung der Pixeldichte Spur 1-4 mit jeweils 1µg Willfact®

Tabelle 16: Daten der ersten quantitativen Messungen der Pixeldichte des VWF aus Abbildung 34

	Spur 1	Spur 2	Spur 3	Spur 4
Gemessene Pixel	4,43E+07	4,80E+07	4,19E+07	4,57E+07
Standardabweichung zwischen den Spuren 1-4	2,5 x 10^6			
Standardabweichung (%)	1,41%			

4.1.2.4 Quantitative Auswertung der Pixeldichte einer Verdünnungsreihe von gereinigtem humanem VWF-Konzentrat Willfact® im Western Blot

Um ein Standardpräparat für das 250 kDa VWF-Fragment herzustellen, wurde gereinigtes humanes VWF-Konzentrat in einer Verdünnungsreihe in einem Western Blot aufgetragen. Es sollte festgestellt werden, ob eine Linearität vorhanden sei. Insgesamt wurden drei dieser Versuche durchgeführt und ausgewertet. Exemplarisch wird in Abbildung 34 einer der Western Blots angezeigt (Verdünnungsreihe A). Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen wurden anschließend in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse die Menge an Wilfact® und auf der Ordinate die Pixeldichte angegeben wurde (Abbildung 35-37).
Die Verdünnungsreihen zeigten alle eine Linearität. Die Reihen A und C ergaben jeweils einen guten Korrelationskoeffizienten von 0,9102. Reihe B zeigte einen zufriedenstellenden Korrelationskoeffizienten von 0,8314.

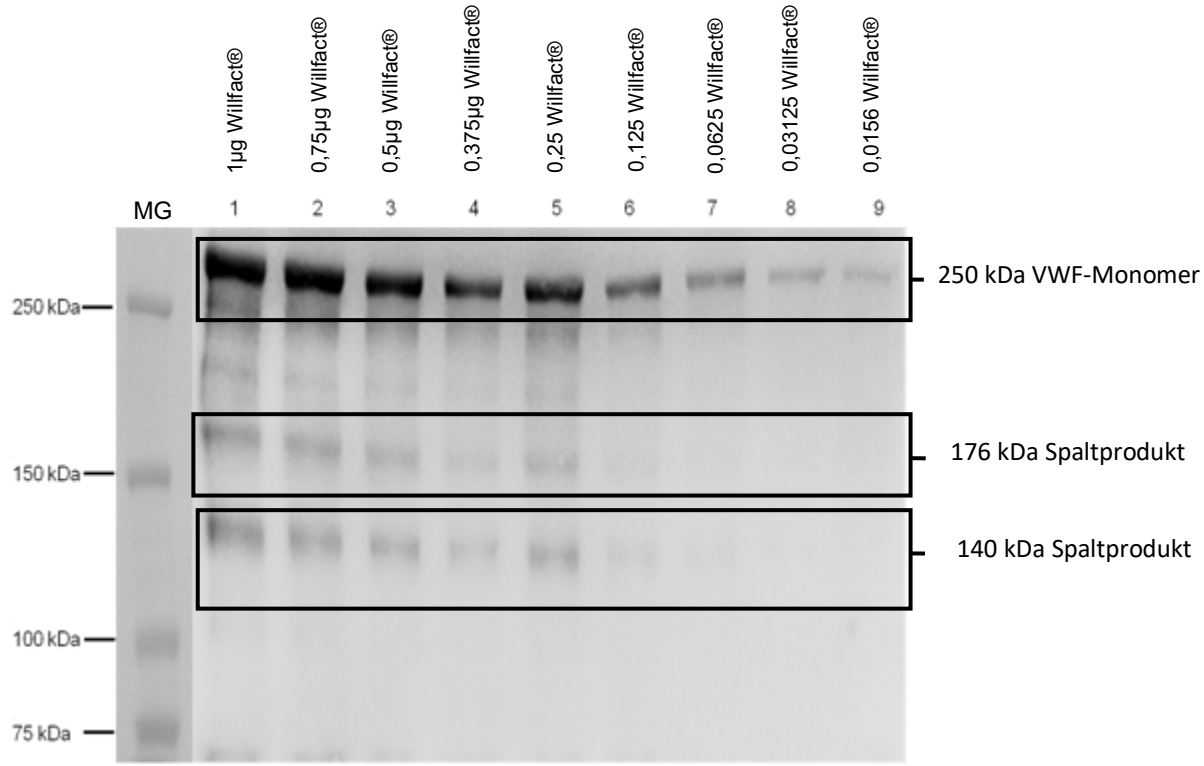

Abbildung 34: Verdünnungsreihe von gereinigtem humanem VWF-Konzentrat Willfact® im Western Blot, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,1s.

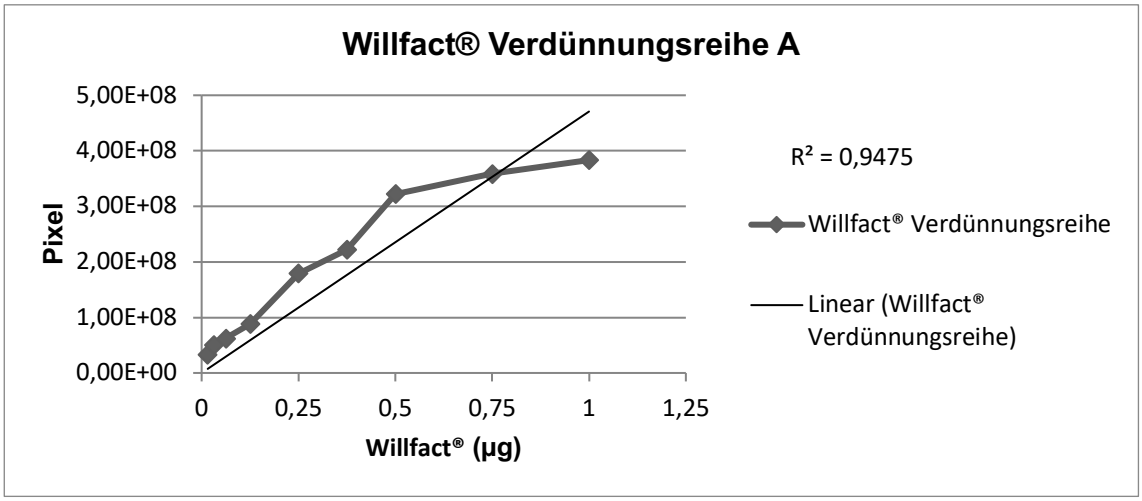

Abbildung 35: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe A Willfact®

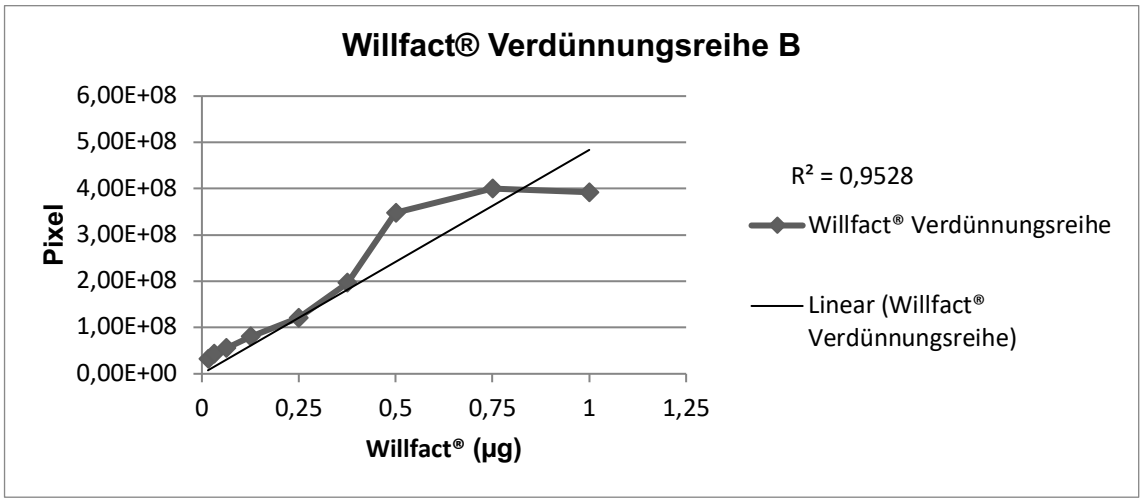

Abbildung 36: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe B Willfact®

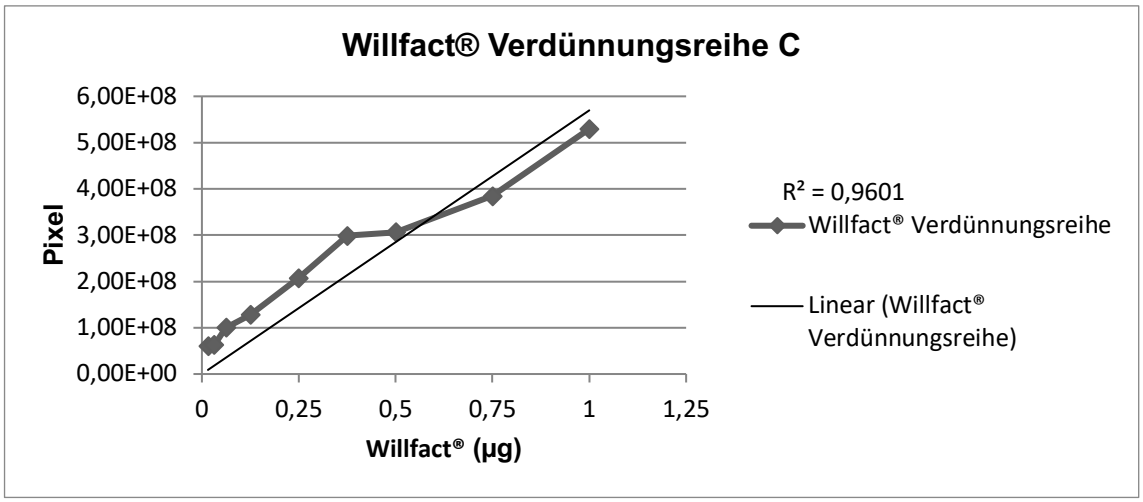

Abbildung 37: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe C Willfact®

Um einen Standard für die Spaltprodukte des VWF zu entwickeln, musste der VWF vollständig *in vitro* gespalten werden. Dazu wurden im beschriebenen Dialyseverfahren (siehe 3.2.2) Willfact® mit in normalem humanem Plasma (NHP) enthaltender ADAMTS13 inkubiert. Anschließend wurde der VWF verdünnt und im Western Blot aufgetragen. Die Stammkonzentration des Willfact® betrug 10 U/ml. Insgesamt wurden drei Dialyseansätze mit jeweils 150 µl Volumen angesetzt. Das wiedergewonnene Volumen mit dem gespaltenem Willfact® wurde gepolt. In Tabelle 17 und 18 sind die Konditionen der VWF-Spaltung (Willfact®) durch ADAMTS13 im Normalplasma im Dialysesystem beschrieben. Abbildung 38 zeigt den dazugehörigen Western Blot vom Versuch der vollständigen Spaltung von Willfact® mittels plasmatischer ADAMTS13 im Dialysesystem.

Tabelle 17: VWF-Spaltung (Willfact®) durch ADAMTS13 im Normalplasma im Dialysesystem (siehe 3.2.2)

1:20 verdünntes NHP (Platelet-poor plasma) (PP))	95 µl TBS Puffer + 5 µl NHP
1:20 Verdünnung mit $BaCl_2$	95 µl 1:20 verdünntes NHP + 5 µl $BaCl_2$
1 µg VWF-Konzentrat (Willfact®)	10 µl Willfact® + 40 µl TBS-Puffer
Ansatz auf Membran: 150 µl	
Wiedergewonnenes Volumen der Membranen nach 24 h Dialyse	
Membran 1	80 µl
Membran 2	95 µl
Membran 3	80 µl
Gepoolter Ansatz Membran 1 – 3	255 µl + 22,5 µl EDTA + 22,5 µl TBS-Puffer = 300 µl gepoolter Ansatz
1 µg VWF ≈ 100 µl gepoolter Ansatz 10 µg Willfact® enthält 1µg VWF	

Tabelle 18: Ansatz zur vollständigen Spaltung von Willfact®

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7	8
Menge VWF in der Spur (µg)	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,0125
Volumen VWF (µl)	30	25	20	15	10	5	2,5	1,25
TBS-Puffer (µl)	-	5	10	15	20	25	27,5	28,75
Probenvolumen für SDS-PAGE (µl)	30	30	30	30	30	30	30	30

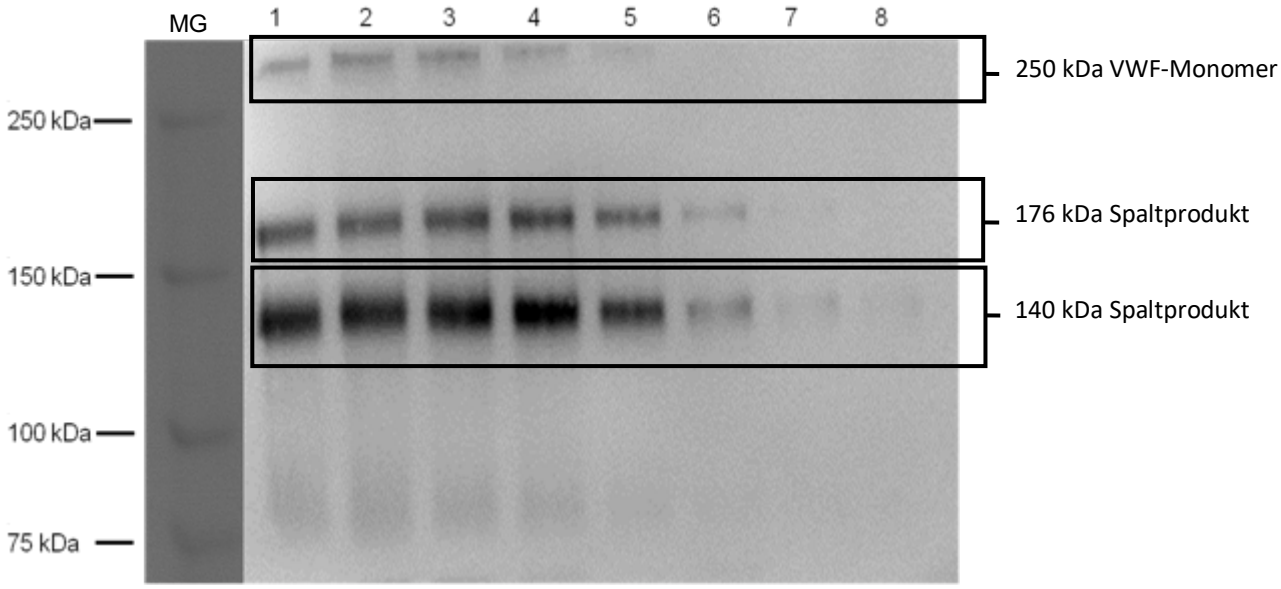

Abbildung 38: Versuch der vollständigen Spaltung von Willfact® mittels plasmatischer ADAMTS13 im Dialysesystem (siehe 3.2.2), 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,5s.

In den Spuren 1-5 von Abbildung 38 erkennt man, dass es in diesem Versuch nicht gelungen war, den VWF vollständig zu spalten. Pro Spur konnte maximal 0,3 µg VWF aufgetragen werden. Die vorherigen Versuche zeigten aber, dass 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B durchaus in der Lage ist Mengen von bis zu einem Mikrogramm an VWF zu adsorbieren. Ferner zeigte sich in den Versuchen der Verdünnungsreihen, dass in dem Willfact® schon partiell gespaltener VWF vorliegt. Es ist zwar aufgrund der schwachen Bandengröße davon auszugehen, dass die Spaltprodukte in geringer Konzentration vorliegen, sich dadurch allerdings Willfact® für ein Standardpräparat nicht eignet. Daher wurden neue Versuche mit rekombinantem VWF (rhVWF) durchgeführt.

4.1.2.5 Quantitative Auswertung der Pixeldichte einer Verdünnungsreihe von rekombinantem VWF im Western Blot

Um ein Standardpräparat für das 250 kDa VWF-Monomer herzustellen, wurde der Versuch aus 4.1.3.2 noch eimal mit rhVWF wiederholt, da sich bei 4.1.3.2 zeigte, dass schon viel Willfact® gespalten vorliegt. Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass auch bei rhVWF eine Linearität zwischen der Pixeldichte im Western Blot und der Menge des aufgetragenen rhVWF vorliegt. Insgesamt wurden drei dieser Versuche durchgeführt und ausgewertet. Abbildung 39 zeigt exemplarisch den Western Blot der Verdünnungsreihe A. Die Verdünnungsreihe A zeigte einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von 0,9476. Die Verdünnungsreihen B und C hatten jeweils einen Korrelationskoeffizienten von 0,9255 und 0,921. Insgesamt fällt im Western Blot auf, dass im Gegensatz zu Willfact® kaum VWF vorlag, der bereits gespalten war.
Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen wurden anschließend in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse die Menge an rhVWF und auf der Ordinate die Pixeldichte angegeben wurde (Abbildung 40-42).

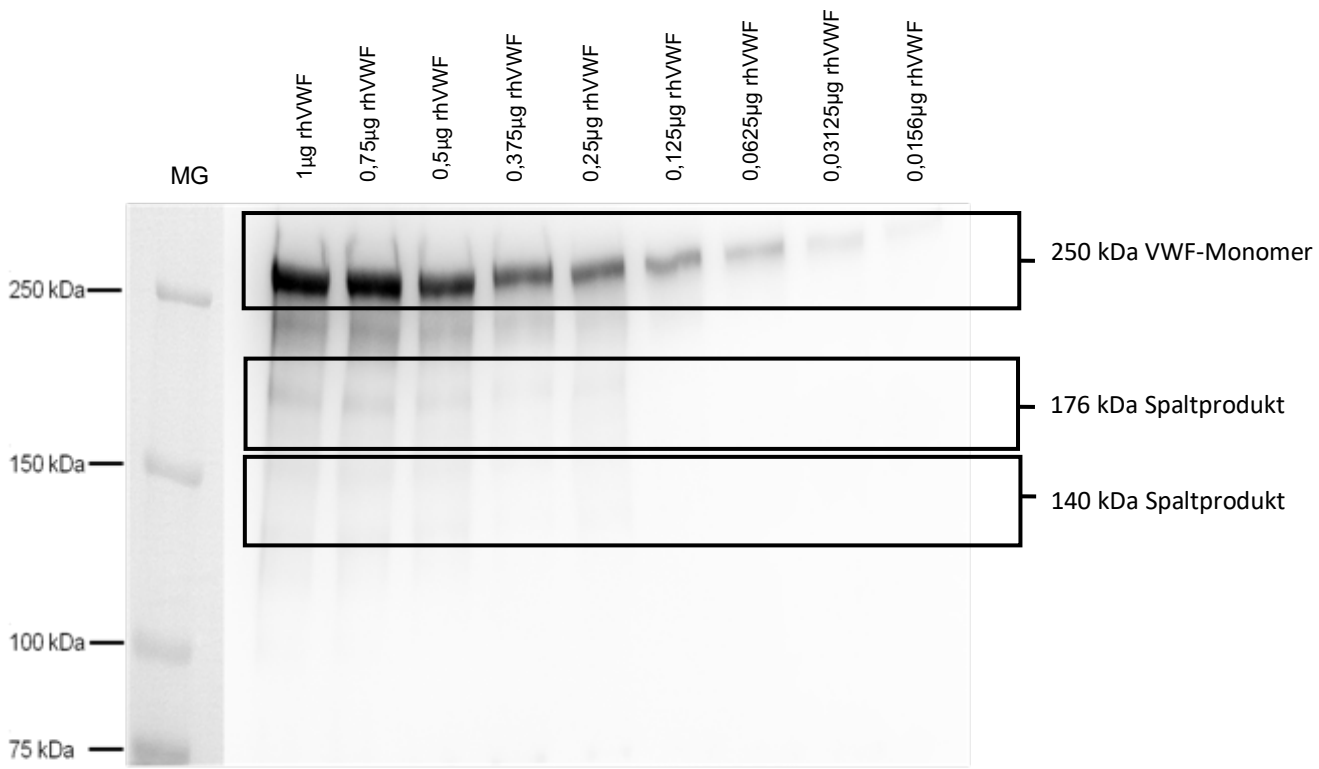

Abbildung 39: Verdünnungsreihe von rekombinaten VWF im Western Blot, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,1s.

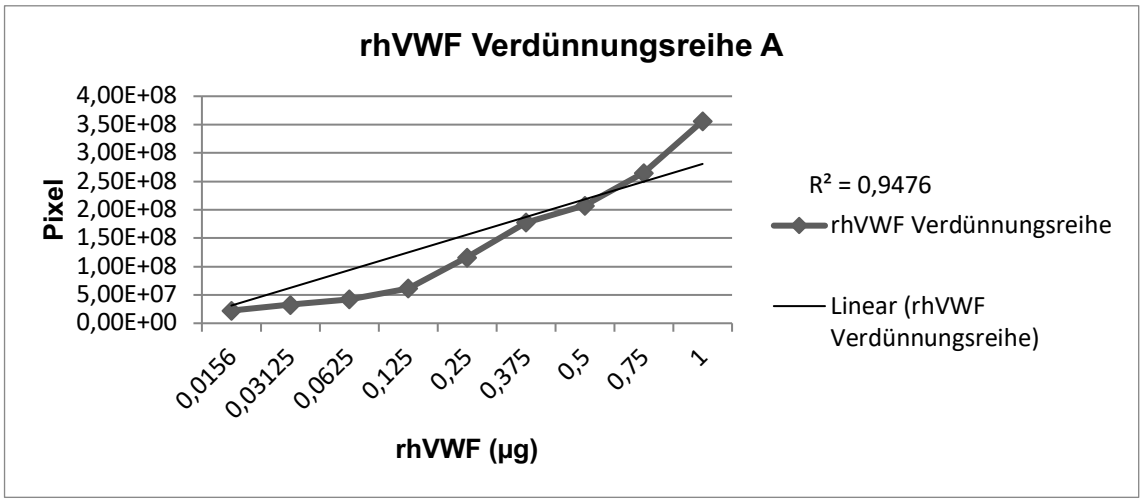

Abbildung 40: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe A, rekombinanter VWF

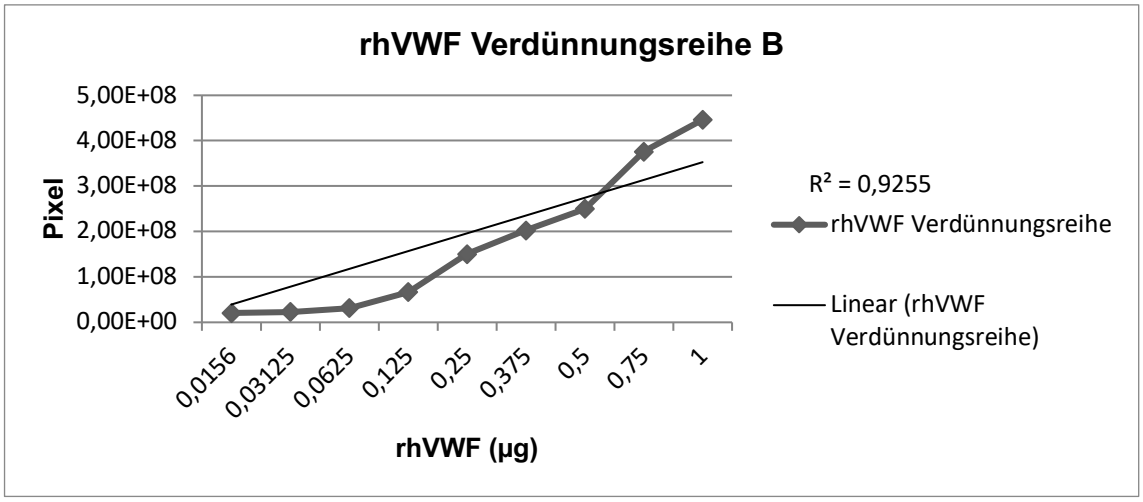

Abbildung 41: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe B, rekombinanter VWF

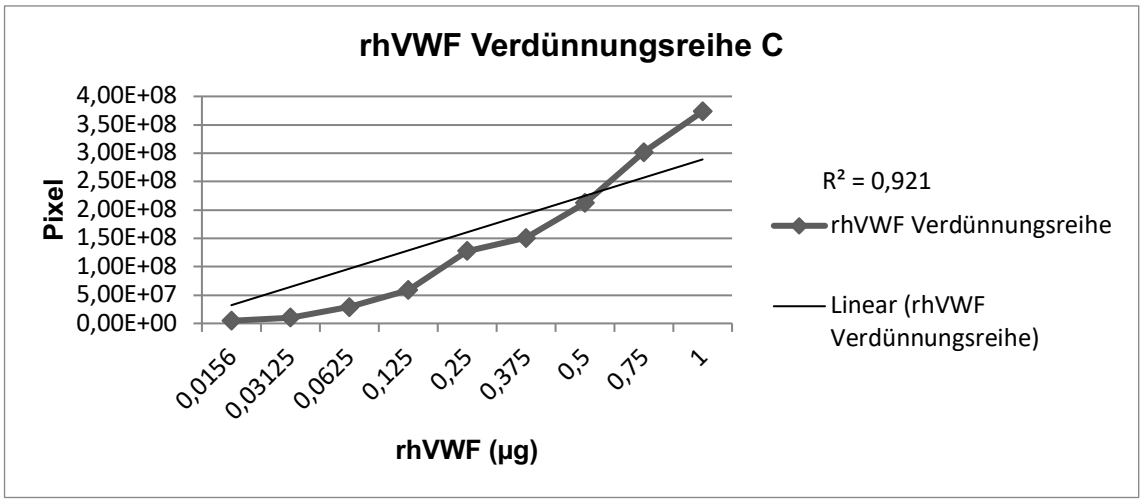

Abbildung 42: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-9 von Verdünnungsreihe C, rekombinanter VWF

4.1.2.6 Versuch der vollständigen Spaltung von rekombinantem VWF mit plasmatischer ADAMTS13

Um den rekombinanten VWF vollständig zu spalten, wurde anstatt des Willfact® nun ein rekombinanter VWF benutzt, der in einer Stammkonzentration von 169 U/ml vorlag (entspricht 1690 µg/ml). Daher war es nun möglich 1 µg rhVWF pro Spur im Western Blot aufzutragen. Gleichzeitig wurden bei diesem Versuch verschiedene Konditionen ausgetestet, um herauszufinden, ob eine Änderung der Konzentration eine stärkere proteolytische Spaltung des rhVWF bewirken könnte. Die Änderungen der Konditionen sind in Tabelle 19 und 20 beschrieben.

Tabelle 19: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen (Ansatz im Dialyse-System)

Vor Dialyse						
Probe	**Dialyse-dauer**	**Harnstoff-konzentration**	**Plasma-verdünnung**	**$BaCl_2$ Konzentration**	**Menge rhVWF**	**Gesamt-volumen**
0	24 h	1,5 M	1:20 NHP	10 mM	1 µg	150 µl
A1	24 h	2,5 M	1:10 NHP	20 mM	1 µg	150 µl
A2	24 h	2,5 M	1:10 NHP	20 mM	1 µg	150 µl
B1	24 h	1,5 M	1:10 NHP	10 mM	1 µg	150 µl
B2	24 h	1,5 M	1:10 NHP	10 mM	1 µg	150 µl
C1	24 h	1,5 M	1:20NHP	10 mM	1 µg	150 µl
C2	24 h	1,5 M	1:20 NHP	10 mM	1 µg	150 µl
C3	24 h	1,5 M	1:20 NHP	10 mM	1 µg	150 µl
C4	24 h	1,5 M	1:20 NHP	10 mM	1 µg	150 µl

Tabelle 20: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen (Ansatz im Western Blot)

Wiedergewonnenes Volumen in µl	**TBS-Puffer (µl)**	**EDTA (200 mM)**	**SDS-Lsg**	**DTT-Lsg.**	**IAA-Lsg.**	**End-volumen**
85	65	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
142	8	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
97	53	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
146	4	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
146	4	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
100	50	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
90	60	7,5 µl	40 µl	10 µl	10 µl	217,5 µl
110	40 + 20	7,5 µl	20 µl	5 µl	5 µl	217,5 µl
100	50 + 20	7,5 µl	20 µl	5 µl	5 µl	217,5 µl

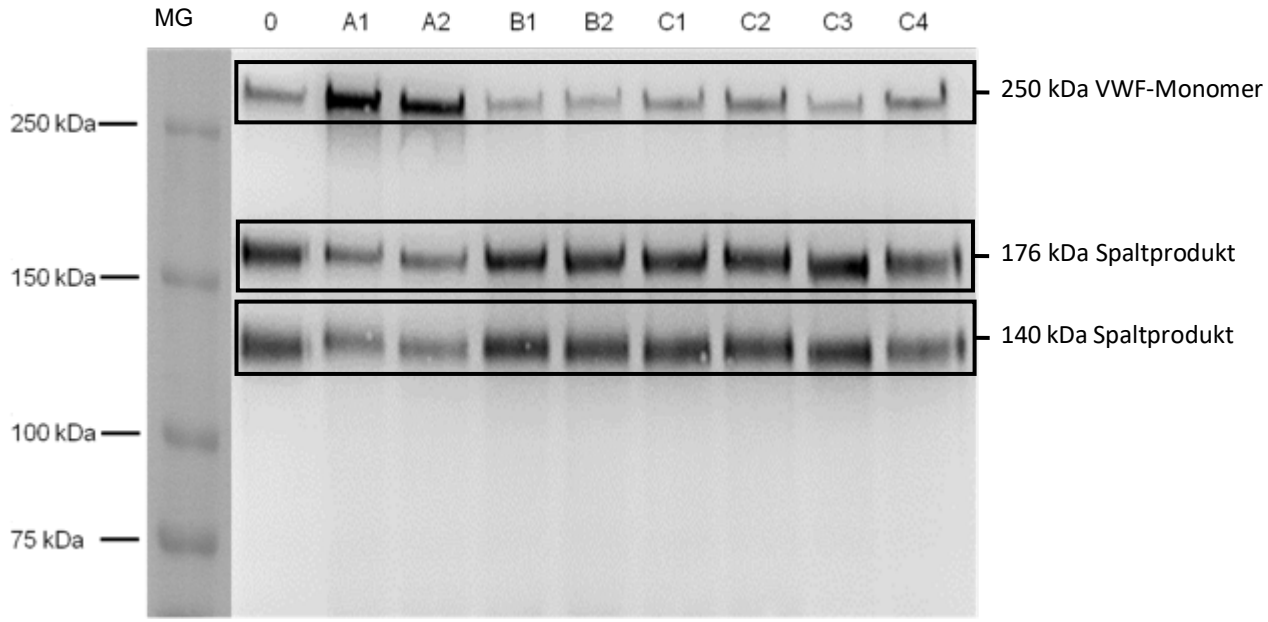

Abbildung 43: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF unter verschiedenen Konditionen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 2,1s.

In jede Spur in Abbildung 43 wurden 60 µl des jeweiligen Endvolumens gegeben (siehe Tabellen 19 und 20). Es ist zu erkennen, dass es keine vollständige Spaltung des rhVWF gab. Weder unter den bislang verwendetenn Konditionen, wie in Spur 1 gezeigt, noch bei erhöhter Harnstoffkonzentration oder veränderter $BaCl_2$-Konzentration konnte eine vollständige Spaltung des rhVWF erzielt werden.

4.1.2.7 Versuch der Spaltung von rekombinantem VWF mittels rekombinanter ADAMTS13

Um den VWF vollständig zu spalten, wurde nun anstatt einer plasmatischen ADAMTS13 eine rekombinante ADAMTS13 ebenfalls von R&D Systems® eingesetzt (rhADAMTS13). Mit dem Einsatz der rekombinanten ADAMTS13 konnte nun auf das Dialyse-System verzichtet werden und der Ansatz wurde bei 37°C in einem Vortexer bei 300 rounds per minute (rpm) gemischt. In den Ansatz wurden 3,55 µl rhVWF = 6µg rhVWF (169 U/ml), 3,261µl = 0,75µg rhADAMTS13 (0,23 mg/ml), und 173,189µl Puffer (1,5 M Harnstoff – 5mM TRIS 10 – 0,1% BSA – 10 mmol $CaCl_2$) pipettiert. In Tabelle 21 sind noch einmal die genauen Zusammensetzungen des Ansatzes beschrieben. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 180 µl. Das anschließende Probenvolumen für die SDS-PAGE/Western Blot betrug 30 µg. Somit wurde pro Spur

1 µg rhVWF aufgetragen. In Abbildung 44 lässt sich eine Abnahme des VWF-Monomers bei 250 kDa erkennen sowie eine Zunahme der Spaltprodukte des rhVWF bei 140 kDa und bei 176 kDa. allerdings war auch mit einer rhADAMTS13 keine vollständige proteolytische Spaltung des rhVWF möglich.

Tabelle 21: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 bei 300 rpm

Nr.	Dauer Proteolyse	EDTA (200 mM)	SDS Lsg.	DTT Lsg.	IAA Lsg.
1	0 h	1,5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
2	1 h	1,5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
3	2 h	1,5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
4	4 h	1,5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
5	24 h	1,5 µl	10 µl	5 µl	5 µl

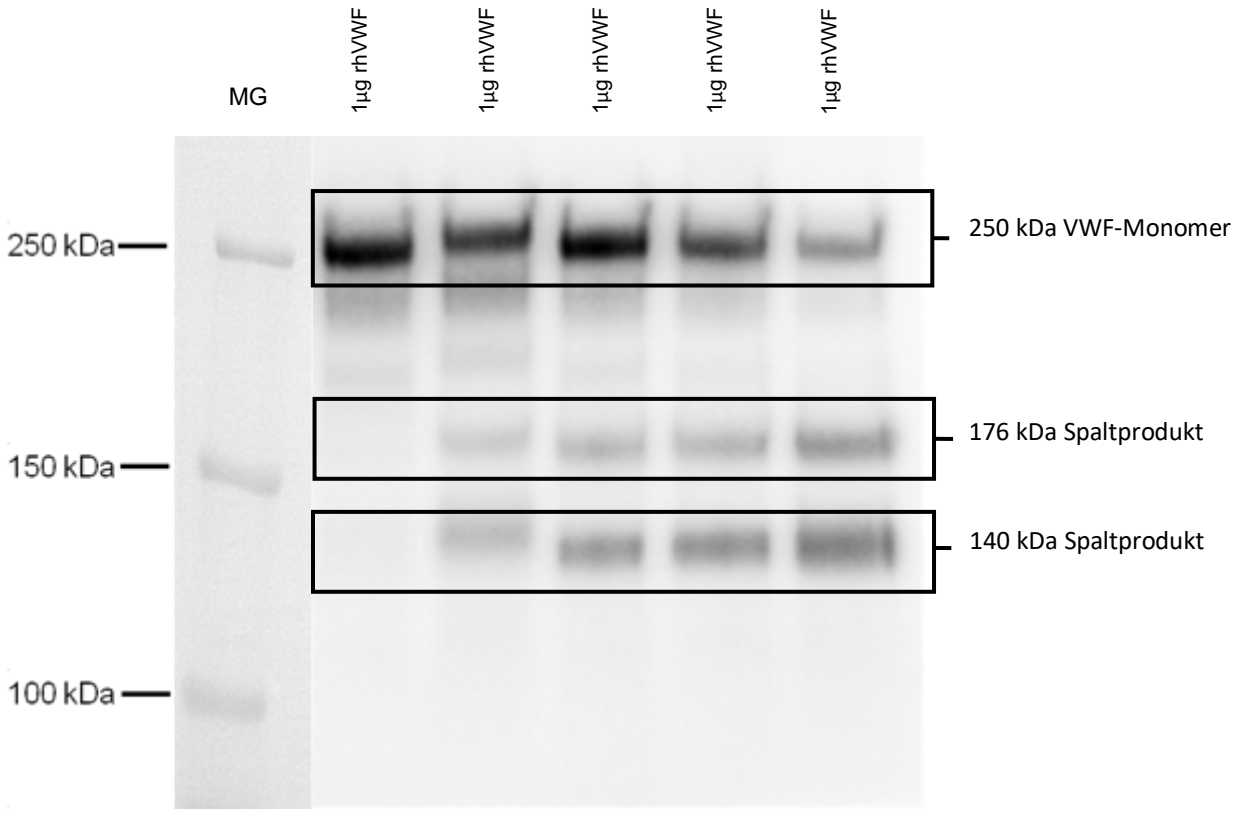

Abbildung 44: Versuch der vollständigen Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 bei 300 rpm, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,3s.

4.1.2.8 Vollständige Spaltung von rekombinantem VWF mittels rekombinanter ADAMTS13

Um eine vollständige Spaltung des rhVWF zu erreichen, wurden die Versuchsbedingungen noch einmal geändert. Dazu wurde der Probenansatz auf einem Vortexer bei 2500 rpm, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde wiederholt neue ADAMTS13 in gleicher Konzentration hinzugegeben. Insgesamt wurden 3 U/ml VWF (= 30µg/ml) mit 6 U/ml (= 6 µg/ml) rhADAMTS13 gespalten. In Tabelle 22 und 23 sind die Einzelheiten über die Versuchsansätze aufgeführt. Tabelle 24 zeigt die Auftragung im Western Blot. Der Westen Blot in Abbildung 45 zeigt, dass es unter den in 4.1.3.7 beschriebenen Versuchsbedingungen zu einer nahezu vollständigen Spaltung des rhVWF kommt. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt (Verdünnungsreihe A, B und C). Die densitometrischen Auswertungen der einzelnen Versuche werden in den Abbildungen 46 (Verdünnungsreihe A), 47 (Verdünnungsreihe B) und 48 (Verdünnungsreihe C) gezeigt. Bei diesem Versuch wurde eine „truncated“ rhADAMTS13 von R&D Systems® eingesetzt. Diese „verkürzte“ rhADAMTS enthält die Metalloprotease (M), Disintegrine (D), die erste TSP1 Wiederholung (T), Cystin-reiche Region (C) und die Spacer-Domäne (S) (= MDTCS). Es wurde beschrieben, dass diese Form in der Lage ist, den VWF zu spalten [117-119].

Densitometrisch ergab sich eine berechnete Beziehung der Menge der Spaltprodukte zur Pixelzahl. Die Linearität der Spaltprodukte ist in den Abbildung 47-49 gezeigt. Durch die vollständige Spaltung des rhVWF war es nun möglich, Standardpräparate für eine densitometrische Quantifizierung herzustellen.

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen wurden anschließend in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse die Menge an gespaltenem rhVWF und auf der Ordinate die Pixeldichte angegeben wurde.

Tabelle 22: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Pufferansätze

Verdünnungspuffer (VP) für Verdünnungsreihe: Gesamtvolumen 50 ml	
0,1 % BSA	50 mg BSA
10 x TBS-Puffer 7.4	5 ml
Aqua dest.	45 ml
ADAMTS13 Cleavage Puffer: Gesamtvolumen 50 ml	
1,5 M Harnstoff	4,5 g Harnstoff
5 mM TRIS-OH	0,0394 g TRIS
0,1 % BSA	50 mg BSA
10 mM $CaCl_2$	500 µl $CaCl_2$ Stammlsg. (1 M)
2 mM $BaCl_2$	500 µl $BaCl_2$ Stammlsg. (200 mM)
pH	8.0

Tabelle 23: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Pipettieransatz

	ADAMTS13	**Stamm-Konzentration rhADAMTS13**	**Volumen rhADAMTS13**	**Stamm-Konzentration rhVWF**	**Volumen rhVWF**	**Volumen Puffer**
Ansatz	truncated protein	0,337 mg/ml	2,67 µl	169 U/ml	5,92 µl	291,41

Tabelle 24: Konditionen für die vollständige Spaltung von rhVWF mit rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen – Ansatz für Western Blot

Probe Nr.	**Volumen Cleavage-Ansatz**		**Verdünnungs-puffer**	**Auftrags-puffer**	**DTT Lösung**	**DTT Lösung**	**IAA Lösung**
1	30 µl	≈ 1 µg VWF	-	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
2	22,5 µl	≈ 0,75 µg VWF	7,5 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
3	15 µl	≈ 0,5 µg VWF	15 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
4	7,5 µl	≈ 0,25 µg VWF	22,5 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
5	3,75 µl	≈ 0,125 µg VWF	26,25 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
6	1,875 µl	≈ 0,0625 µg VWF	28,125 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
7	0,938 µl	≈ 0,03125 µg VWF	29,06 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
8	0,469 µl	≈ 0,015625 µg VWF	29,53 µl	20 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl

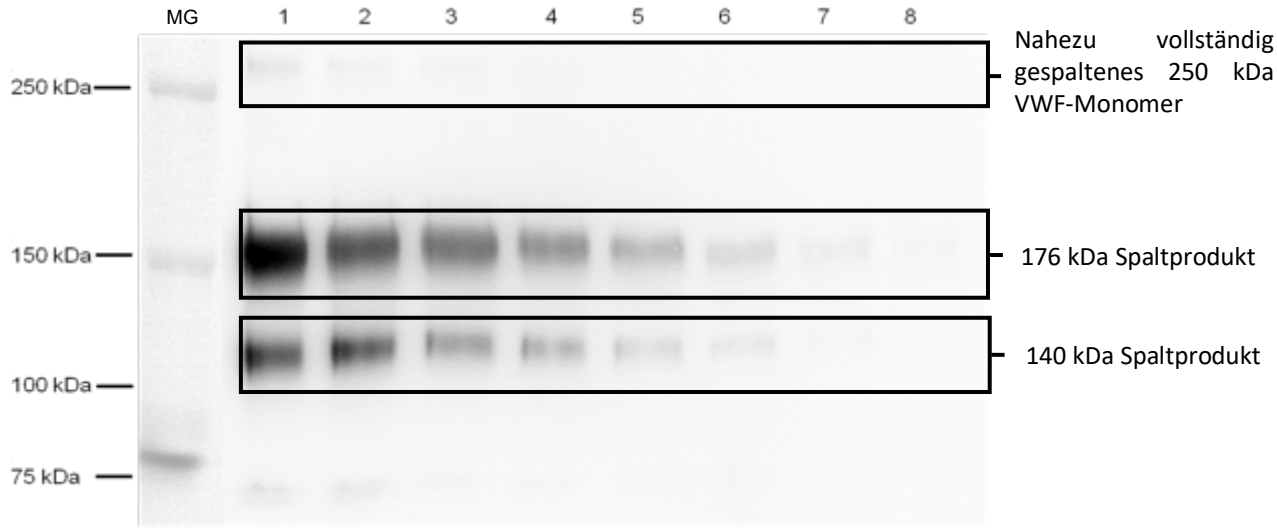

Abbildung 45: Nahezu Vollständige Spaltung von rhVWF mit trunkierter rhADAMTS13 unter modifizierten Bedingungen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 9,1s.

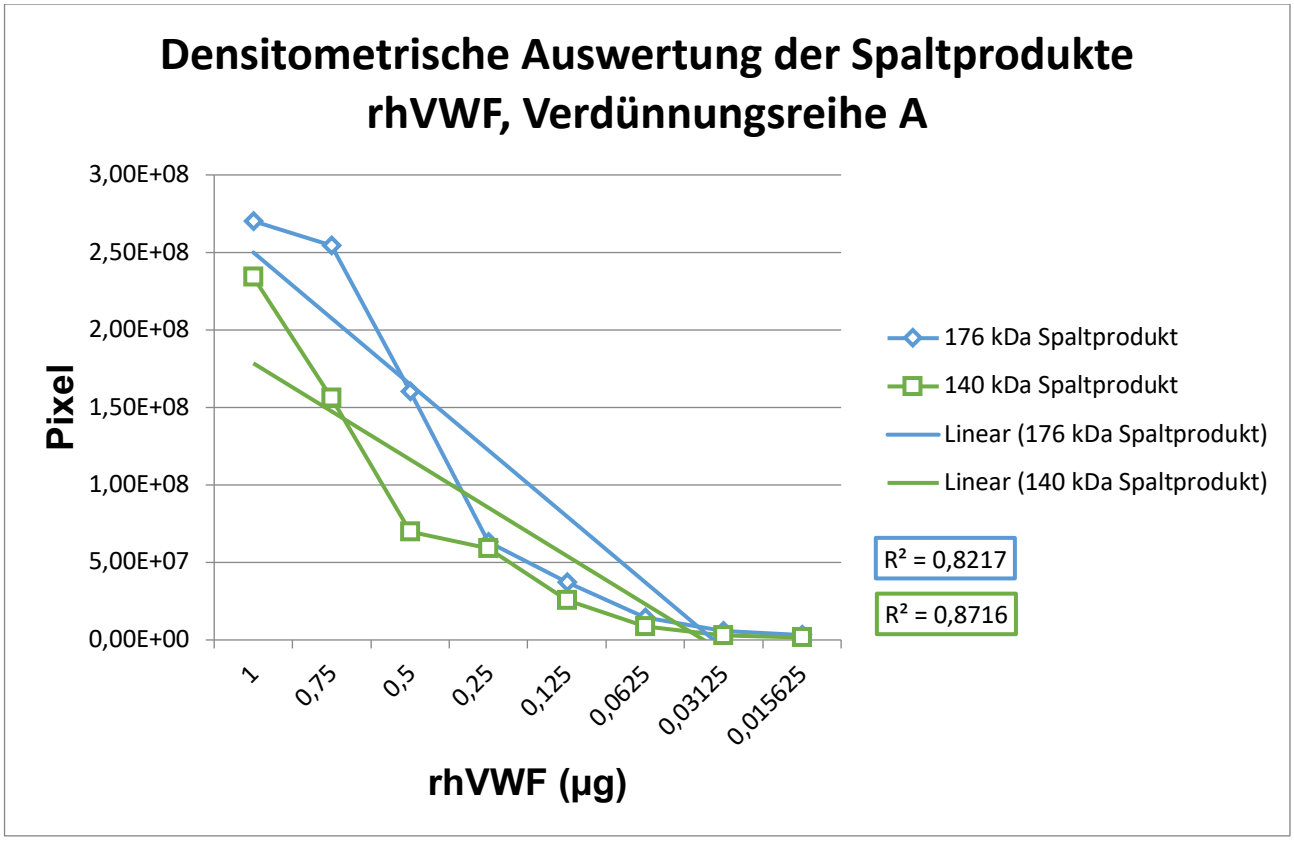

Abbildung 46: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe A

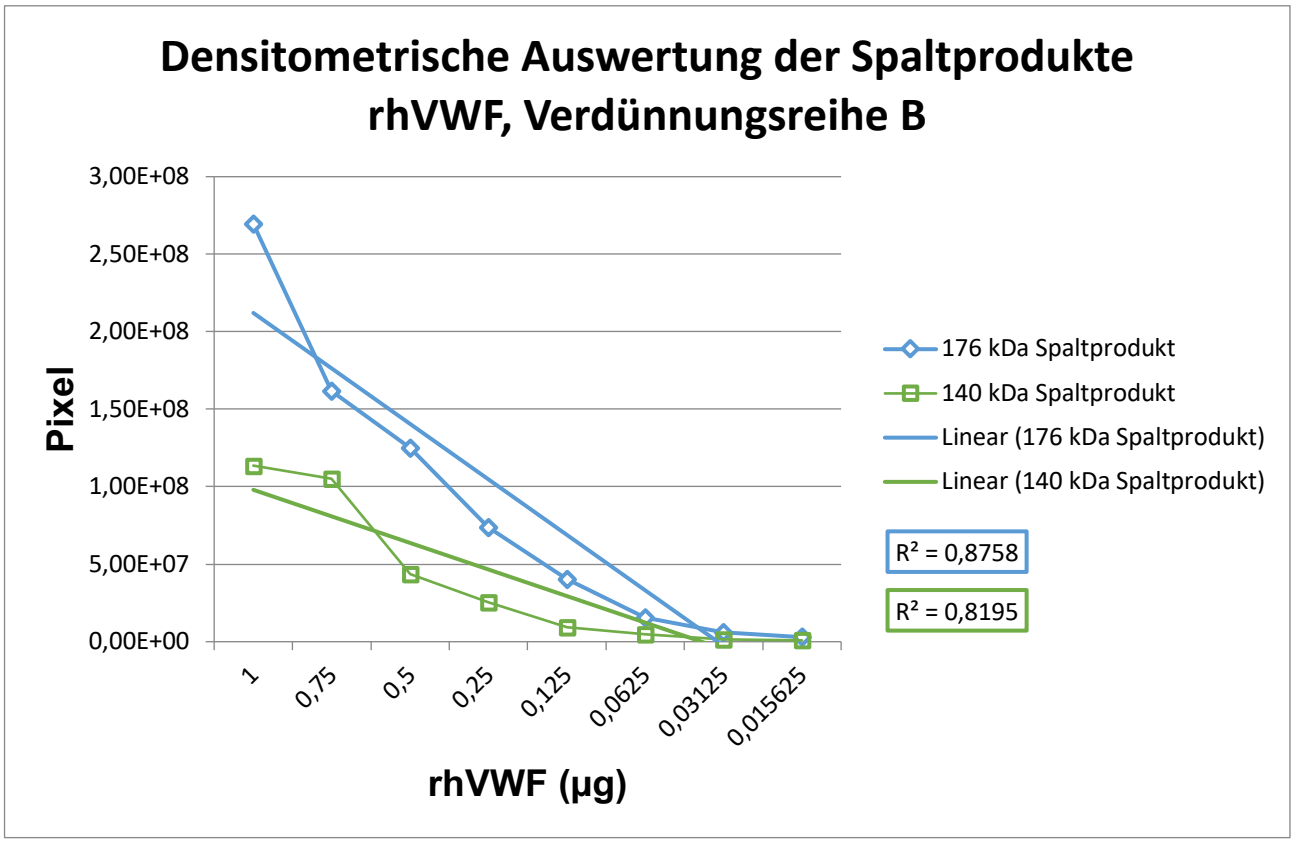

Abbildung 47: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe B

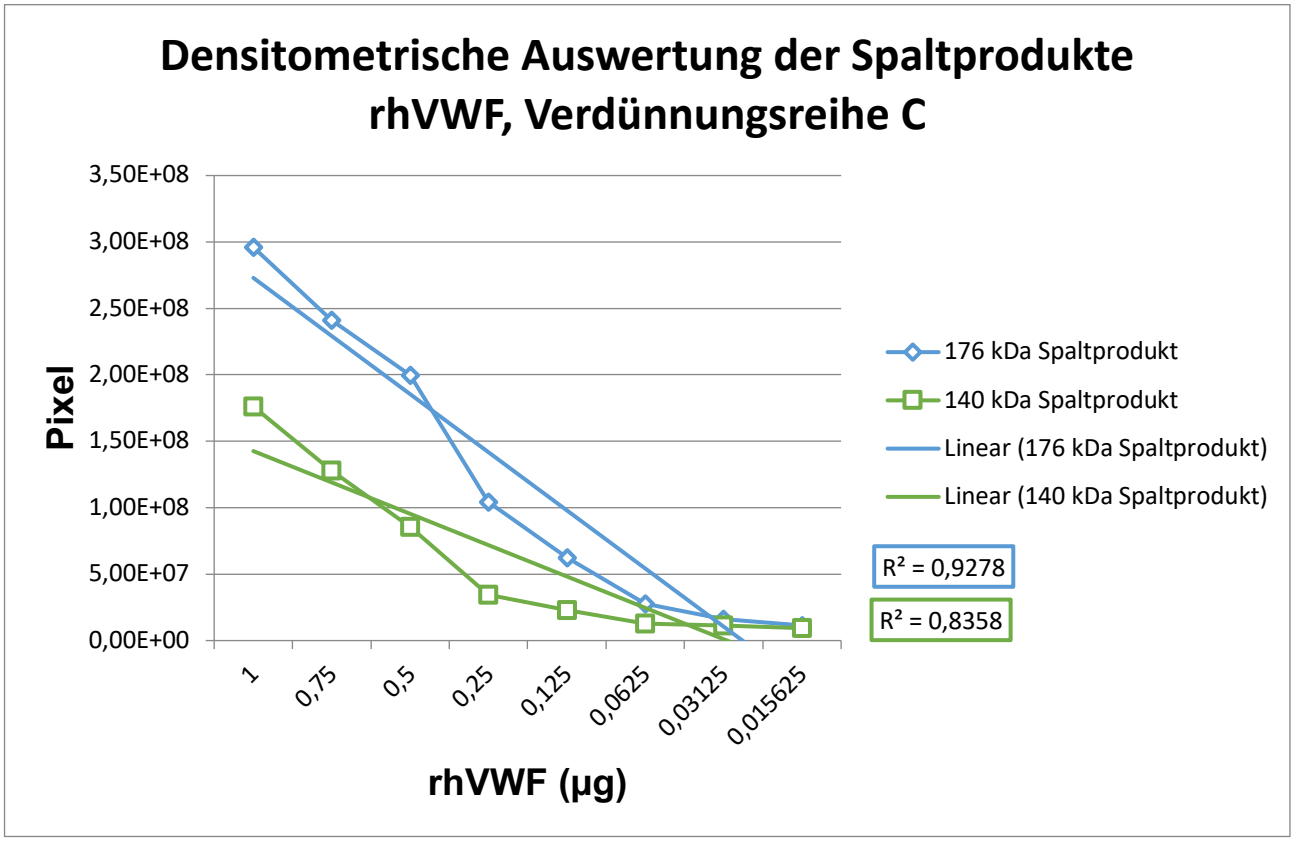

Abbildung 48: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-8 von Verdünnungsreihe des vollständig gespaltenem rhVWF von Verdünnungsreihe C

4.1.2.9 Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf

In diesem Versuch wurde rhVWF im zeitlichen Verlauf gespalten und zusammen mit Standardpräparaten von rhVWF mittels Western Blot analysiert. Ziel war es, die zeitlich abhängige Spaltung des rhVWF durch rhADAMTS13 zu zeigen, so wie eine anschließende Quantifizierung anhand der Standardpräparate durchzuführen. Die Standardpräparationen für das rhVWF Spaltprodukt wurden nach den in 4.1.3.7 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Proteolyse wurden eine Konzentration von 33,33 µg/ml rhVWF sowie eine Konzentration 3 µg/ml truncated rhADAMTS13 eingesetzt und anschließend 1:2 mit Puffer verdünnt. Der Puffer bestand aus einer 1,5 M Harnstoff-Lösung mit 5 mM TRIS, 0,1 % BSA, 10 mM $CaCl_2$, 2 mM $BaCl_2$ bei einem pH von 8.0, Der Probenansatz wurde auf einem Vortexer bei 2500 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Tabelle 25 zeigt die Probenverteilung im Western Blot aus Abbildung 49.

Tabelle 25: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf, BLOT A

Blot Abbildung 49		
Spur	rhVWF-Monomer Standard (µg)	rhVWF Proteolysedauer (min)
1	0,75	
2	0,5	
3	0,25	
4	0,125	
5	-	-
6		0
7		10
8		40
9		120

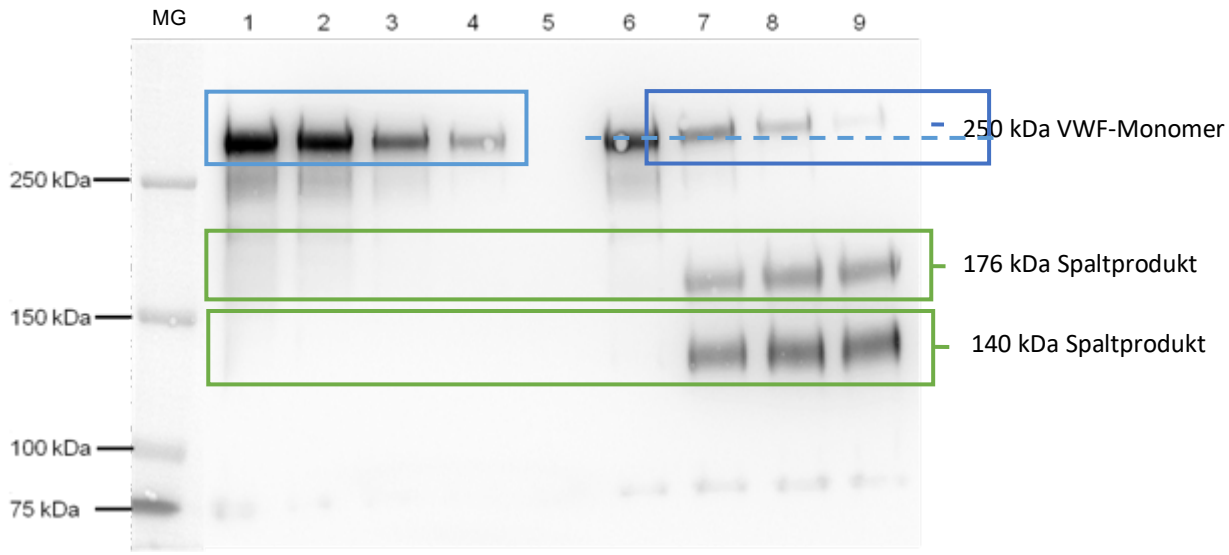

Abbildung 49: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf – Abnahme des VWF-Monomers und parallele Zunahme der 176kD und 140kD-Fragmente – BLOT A, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 8,7s.

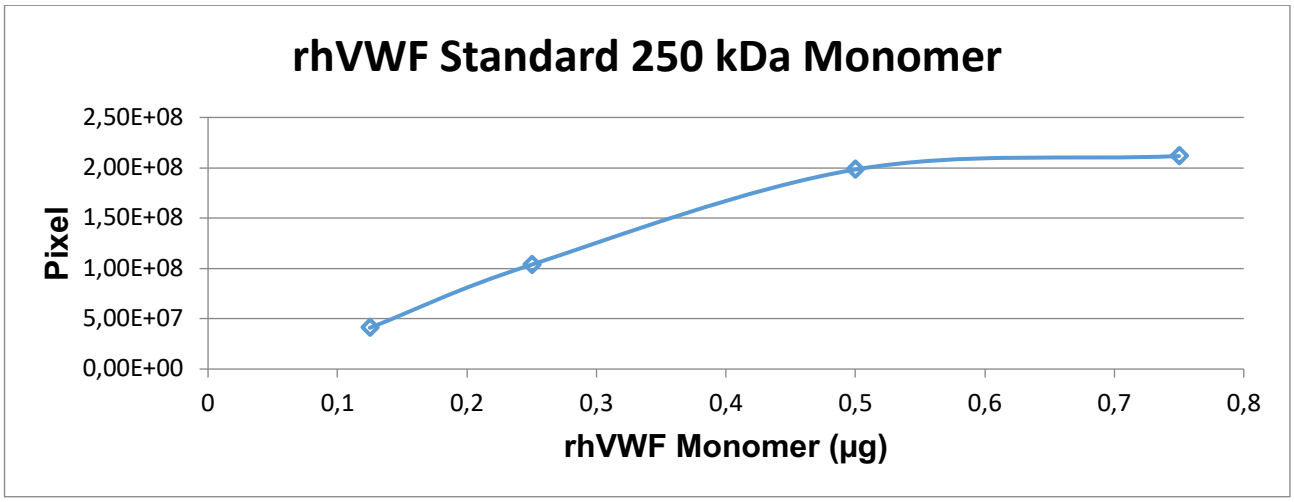

Abbildung 50: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-4 aus Abbildung 50 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT A

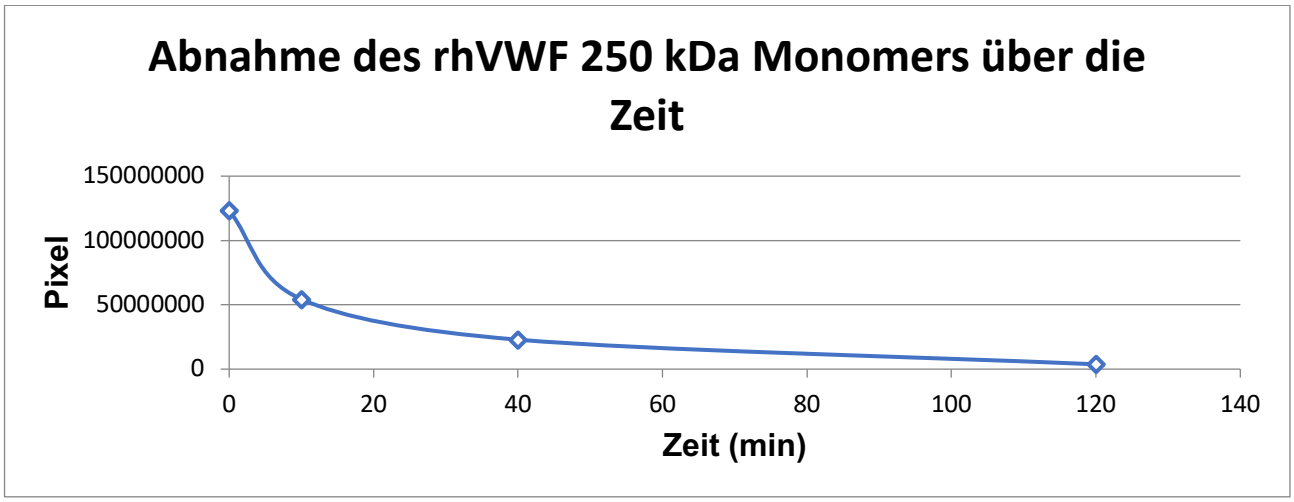

Abbildung 51: Auswertung der Pixeldichte Spuren 6-9 aus Abbildung 50 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT A

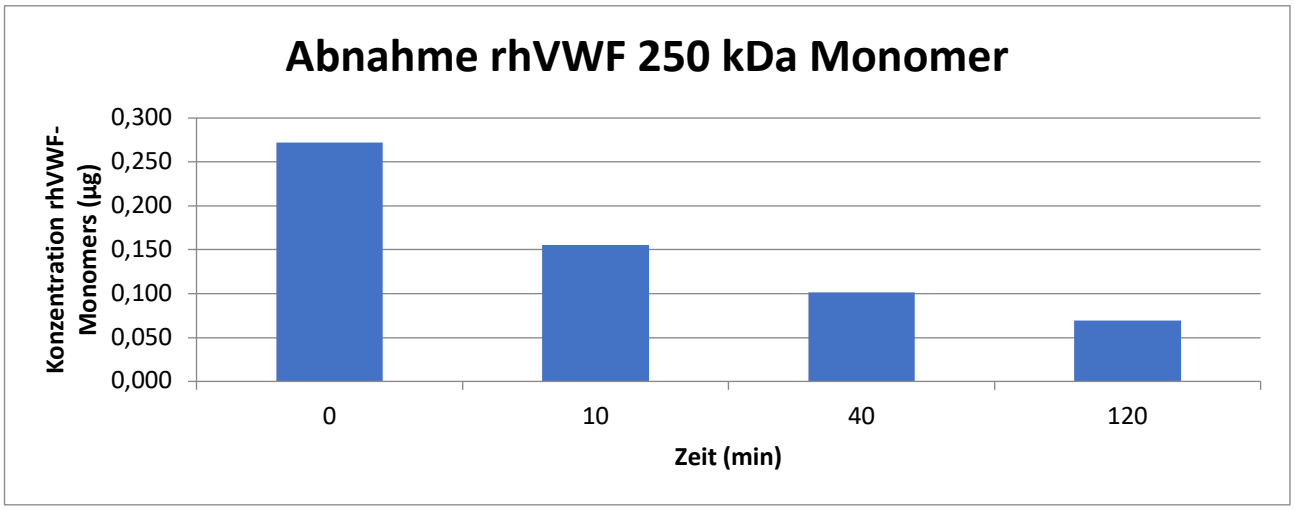

Abbildung 52: Abnahme des rhVWF 250 kDa Monomers aus Abbildung 50 Spur 6-9 – BLOT A im Säulendiagram

In den Abbildungen 50-52 ist graphisch zu sehen, dass es in Abbildung 49 in den Spuren 6-9 zu einer Abnahme des VWF-Monomers kommt. Die Abnahme der Pixeldichte erfolgt dabei nicht anhand eines linearen Verlaufs. In den Spuren 1-4 der Abbildung 49 sind Standardpräparationen für das 250 kDa Monomer aufgetragen.
Der gleiche Versuchsaufbau wie in Abbildung 49 wurde nochmal gewählt mit dem Unterschied, dass in den Spuren 1-4 nicht ein Standardpräparat des 250 kDa Monomer aufgetragen wurde, sondern Standardpräparate der Spaltprodukte des 176 kDa- und 140 kDa-Spaltprodukts. Tabelle 26 zeigt die Probenverteilung im Western Blot aus Abbildung 53.

Tabelle 26: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf für das VWF-Monomer und für das rhVWF Spaltprodukt, BLOT B

Blot Abbildung 53		
Spur	176 kDa- und 140 kDa-Spaltprodukt-Standards (µg)	rhVWF Proteolysedauer (min)
1	0,75	
2	0,5	
3	0,25	
4	0,125	
5	-	-
6		0
7		10
8		40
9		120

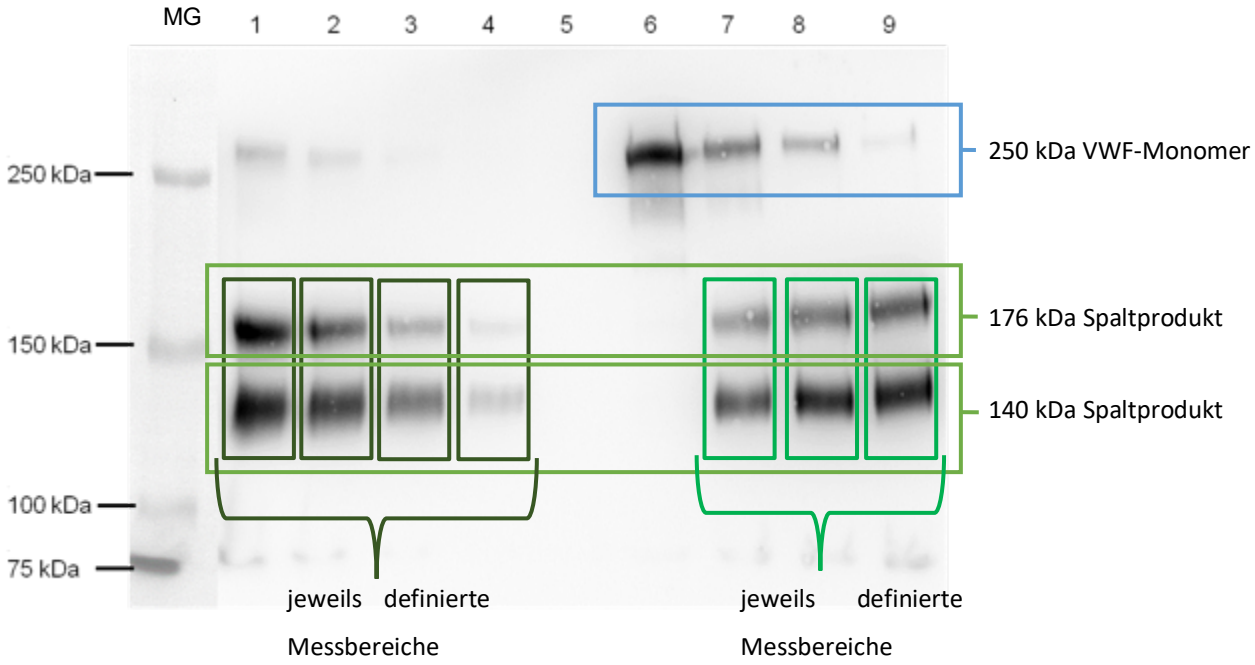

Abbildung 53: Spaltung des rhVWF im zeitlichen Verlauf für das VWF-Monomer und für das rhVWF Spaltprodukt – BLOT B, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 12s.

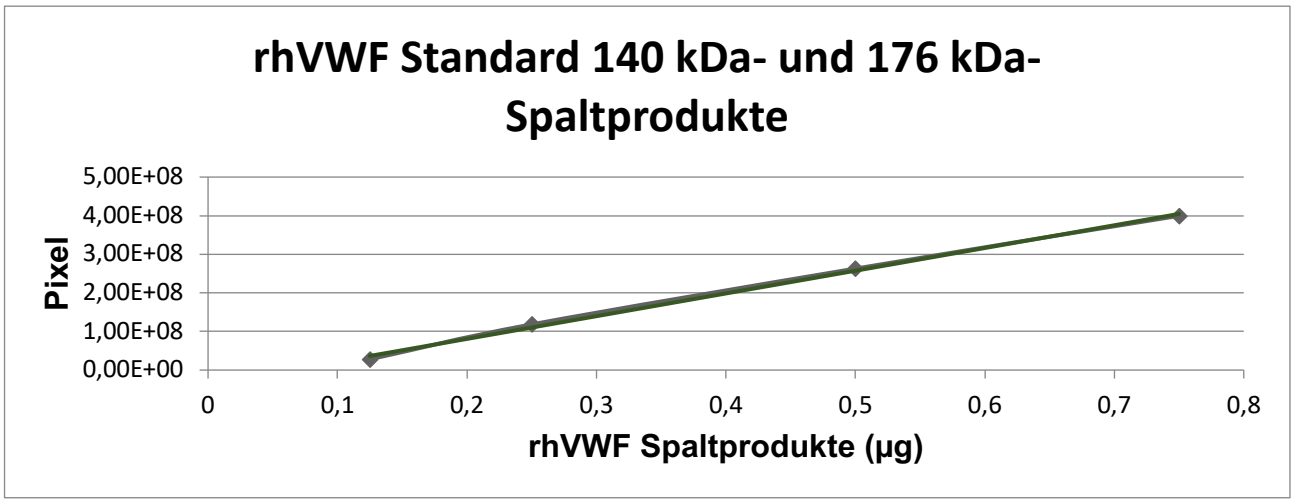

Abbildung 54: Auswertung der Pixeldichte Spuren 1-4 aus Abbildung 54 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT B

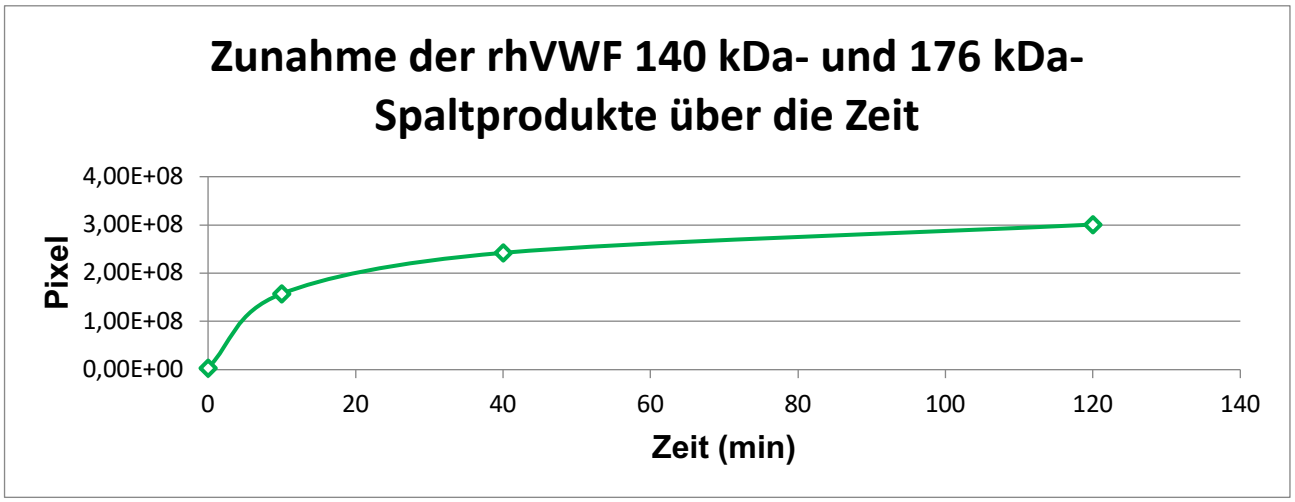

Abbildung 55: Auswertung der Pixeldichte Spuren 6-9 aus Abbildung 54 von Verdünnungsreihe des rhVWF – BLOT B

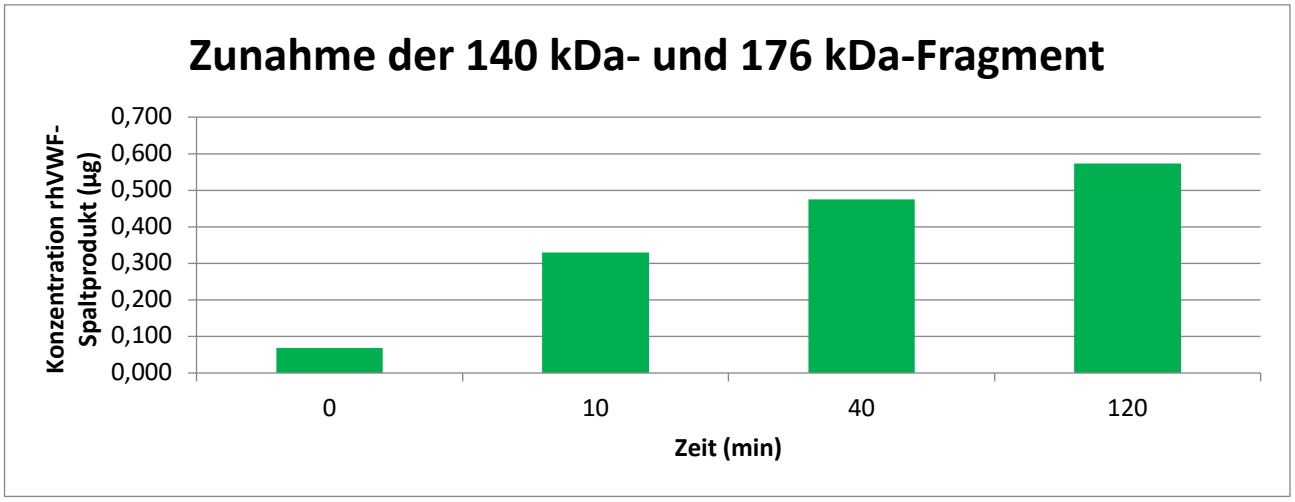

Abbildung 56: Zunahme der rhVWF-Spaltprodukte aus Abbildung 54 Spur 6-9 – BLOT B im Säulendiagram

Die Pixeldichte der Spaltprodukte wurde zusammen bestimmt und nicht für jedes Spaltprodukt separat. In Abbildung 53 erkennt man die bestimmten Ausschnitte, in denen die Pixeldichte bestimmt wurde anhand der roten Markierungen. Zusätzlich lief noch ein Proteinmarker mit. Spur 5 diente als Platzhalter, in dem keine Probe aufgetragen wurde. In den Abbildungen 54-56 ist zu erkennen, dass es zu einer Zunahme der 176 kDa- und 140 kDa-Fragmente über die Zeit kommt. Auch hier ist es keine lineare Zunahme, sondern im Verlauf eine Sättigungskurve.

4.1.2.10 Konzentrationsermittlung von adsorbiertem plasmatischem VWF-Monomer und seiner 176 kDa- unnd 140 kDa-Spaltprodukte im Probandenplasma mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF

In Abbildung 57 wurden drei Standardpräparate für das 250 kDA Monomer (Spuren 1-3) sowie drei Standardpräparate für den gespaltenen VWF aufgetragen (Spuren 4-6). In den Spuren 7 bis 9 sind Sepharose-Bead-Adsorptionen von drei Probandenplasmen. Die Sepharose-Bead-Adsorptionen wurden mit den in 4.1.1.3 beschriebenen Bedingungen mit 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma durchgeführt. Bei den Versuchsbedingungen wurde streng darauf geachtet, dass eine *in vitro* Proteolyse durch Zugabe eines Proteaseinhibitors (Complete, Roche®) verhindert wurde. Anhand der Standardkurven (Abbildung 58 und 59) konnten das 250 kDa VWF-Monomer, sowie die VWF-Spaltprodukte der Probanden berechnet werden (siehe Tabelle 28). Dabei wurden die Werte für das 250 kDa-Monomer extrapoliert, da diese außerhalb unserer Standardkurve lagen.

Tabelle 27: Konzentrationsermittlung von absorbiertem plasmatischem VWF mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF

Spur 1	Standard 1	1 µg ungespaltener rhVWF
Spur 2	Standard 2	0,75 µg ungespaltener rhVWF
Spur 3	Standard 3	0,5 µg ungespaltener rhVWF
Spur 4	Standard 4	0,25 µg gespaltener rhVWF
Spur 5	Standard 5	0,125 µg gespaltener rhVWF
Spur 6	Standard 6	0,06125 µg gespaltener rhVWF
Spur 7	Proband A	VWF aus adsorbiertem Plasma
Spur 8	Proband B	VWF aus adsorbiertem Plasma
Spur 9	Proband C	VWF aus adsorbiertem Plasma

Abbildung 57: Konzentrationsermittlung von adsorbiertem plasmatischem VWF mit Hilfe von vollständig gespaltenem rekombinantem VWF, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 4,2s

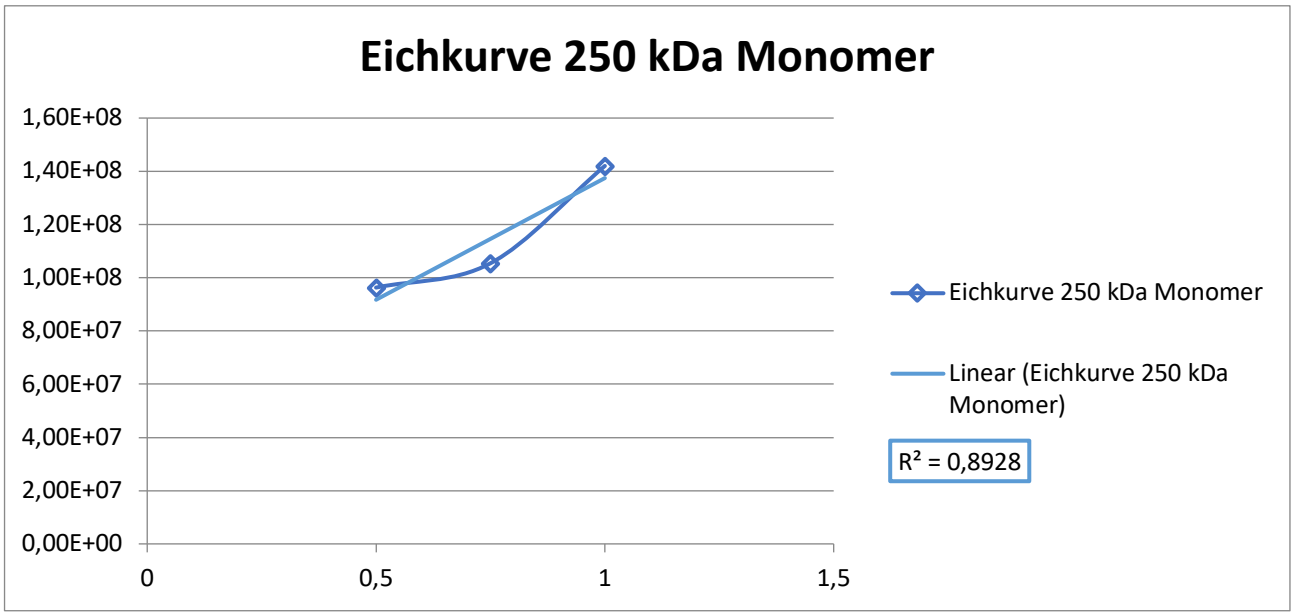

Abbildung 58: Eichkurve für das 250 kDa Monomer (Standards 1-3) von Abbildung 58

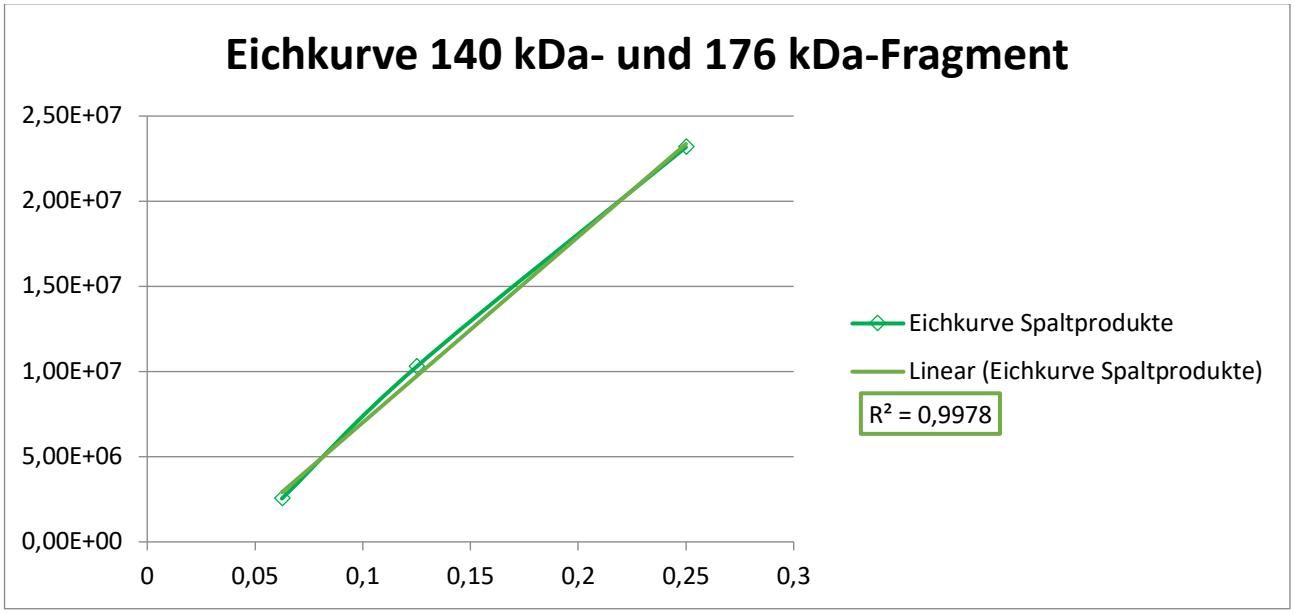

Abbildung 59: Eichkurve für die rhVWF Spaltprodukte (Standards 4-6) von Abbildung 58

Tabelle 28: Berechnung des VWF-Monomers und der 176kDa- und 140kDa-Fragmente anhand der Eichkurven aus Abbildung 58

Proband	250 kDa VWF-Monomer	VWF-Spaltprodukte
Proband A	1,74 µg	0,120 µg
Proband B	1,10 µg	0,125 µg
Proband C	1,45 µg	0,126 µg

4.1.3 Verwendung diverser primärer Antikörper zum Nachweis des VWF und seiner Fragmente induziert mittels rhADAMTS13 und Plasmin im Western Blot

Um Fragmente des VWFs besser zu charakterisieren, wurde neben dem polyklonalen primären Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper auch andere, monoklonale Antikörper gegen spezifische Epitope des VWF verwendet. Insgesamt wurden drei weitere Antikörper eingesetzt. Zum einen ein monoklonaler anti-VWF-A2-Antikörper (anti-VWF-A2-AK) von R&D Systems®, der gezielt gegen das Neoepitop auf dem N-terminalen 140 kDA Fragment gerichtet ist, welches durch die proteolytische Spaltung des VWF entsteht (monoklonale-Maus IgG2B Klon #210909) [120]. Neben dem anti-VWF-A2-AK wurden noch zwei weitere monoklonale Antikörper M7 und M31 eingesetzt. Die Antikörper wurden von S. D. Berkowitz et al. beschrieben [106].
Da es sich sowohl beim anti-VWF-A2-AK als auch bei den M7 und M31 um monoklonale Maus-Antikörper handelt, wurden diese mit einem sekundären HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK detektiert.

4.1.3.1 Darstellung des 140 kDa-N-terminalen Fragments des rekombinanten VWF mittels anti-A2-VWF-Antikörper

In einem Western Blot wurden insgesamt vier Proben aufgetragen. Die Probenauftragung ist in Tabelle 29 aufgeführt. Ziel war es mit dem anti-VWF-A2-AK zu zeigen, dass es nur zu einer Markierung des Neoepitops auf dem N-terminalen 140 kDA Fragment des gespaltenem VWF kommt. Gleichzeitig wollten wir aussschließen, dass es bei einer Plasmin-induzierten Spaltung weder zu einer Detektierung von plasmingespaltenem VWF kommt, noch zu Kreuzreaktionen mit dem HRP-gekoppelten sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-AK. Abbildung 60 zeigt den dazugehörigen Western Blot. Man kann erkennen, dass nur in Spur 1 ein Band bei 140 kDa sichtbar ist. Dieser Klon detektiert nur durch ADAMTS13 gespaltenen VWF am Neo N-Terminus, hingegen keine Plasmin-induzierten VWF-Spaltprodukte.

Tabelle 29: Probenzusammensetzung Abbildung 61

Spur	Probe	Antikörper
1	rhVWF partiell gespalten mittels ADAMTS13	Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundär-Antikörper HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus-AK
2	rhVWF partiell gespalten mittels Plasmin	Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundär-Antikörper HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus-AK
3	rhVWF partiell gespalten mittels ADAMTS13	kein Primärantikörper; nur Sekundärantikörper HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus-AK
4	rhVWF partiell gespalten mittels Plasmin	kein Primärantikörper; nur Sekundärantikörper HRP-gekoppelter Ziege-anti-Maus-AK

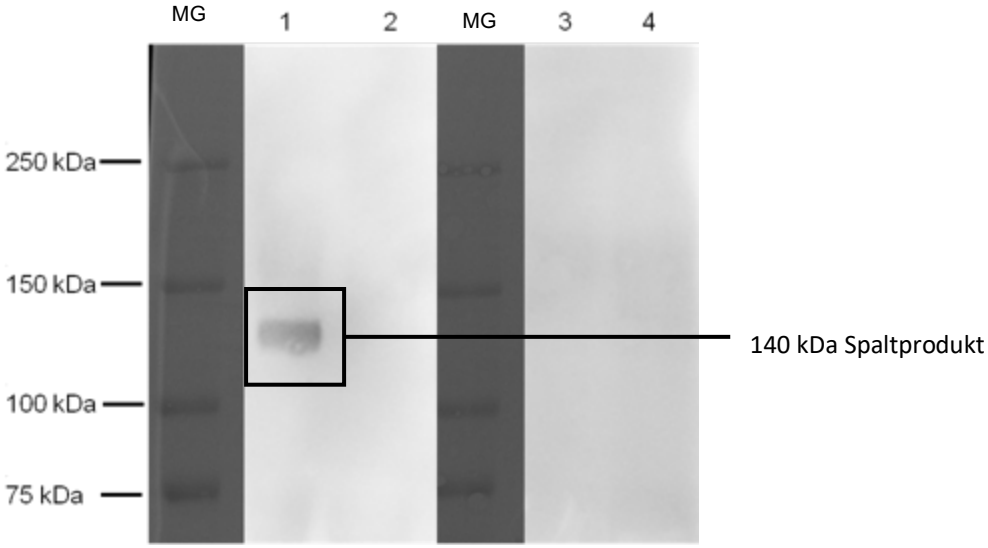

Abbildung 60: Darstellung des 140 kDa-Fragments in rekombinantem VWF mittels anti-A2-VWF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5s.

Spaltungskonditionen für ADAMTS13-Proben (Spur 1 und 3)

Spaltungsansatz: 5,92 µl rhWFV (169 U/ml), 19,56 µl rhADAMTS13 (230 mg/ml) 274,52v µl Puffer (1,5 M Harnstoff, 0,1% BSA, 10 mM CaCl2, 5 mM TRIS bei einem pH von 8.0). Gesamtvolumen 300 µl. Aliquotvolumen für SDS-PAGE und Western Blot 30 µl. Die partielle Spaltung erfolgte über 24 Stunden. Es wurde anschließend 1µg partiell gespaltener rhVWF pro Spur aufgetragen.

Spaltungskonditionen für Plasmin-Proben (Spur 2 und 4)

Spaltungsansatz: 29,586 µl rhWFV (169 U/ml), 0,721 µl Plasmin (1,04 mg/ml) und 1469,7 µl Puffer (TBS-Puffer 150mM NaCl, 0,1% BSA pH 7.4). Gesamtvolumen von 1500 µl. Aliquotvolumen für SDS-PAGE und Western Blot 30 µl. Die partielle Spaltung erfolgte über 24 Stunden Es wurde anschließend 1 µg partiell gespaltener rhVWF pro Spur aufgetragen.

4.1.3.2 Untersuchung des VWF unnd seiner Fragmente nach Adsorption an CNBr-aktivierte Sepharose 4B anhand der Antikörper M7 und M31

In Abbildung 61 wurde eine Adsorption von VWF mit CNBr-aktivierter Sepharose 4B unter den in 4.1.1.3 beschriebenen Bedingungen mit 1000 µl 1:4 verdünntem Probandenplasma durchgeführt. Dabei handelte es sich um nicht-aktiviertes Plasma, sodass wir nur von einer geringem Menge an VWF-Fragmenten ausgehen konnten. Spur 1 wurde nur mit einem sekundären HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK entwickelt, um unspezifische Reaktionen des Antikörpers auszuschließen. In Spur 2 wurde die Sepharose-Bead-Adsorption mit dem Primärantikörper anti-VWF-A2-AK und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AK entwickelt. Es ist keine Bande bei 140 kDa zu erkennen. In Spur 3 wurde als Primärantikörper der M7-Antikörper benutzt. Sekundärantikörper war der HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-AK. Hier zeigt sich bei 140 kDa eine deutliche Bande sowie das VWF-Monomer bei 250 kDa. In Spur 4 wurde als Primärantikörper der M31-Antikörper benutzt. Sekundärantikörper war der HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-AK. Hier zeigt sich bei 176 kDa eine deutliche Bande. Ebenso zeigt sich bei 180 kDa eine Bande. In Spur 5 wurde der HRP-gekoppelte polyklonale Kaninchen-anti-human-VWF zum Detektieren des VWF eingesetzt. Es zeigten sich starke Banden bei 140 kDa, 176 kDa, eine schwache Bande bei 180 kDa und eine starke Bande bei 250 kDa. Die Antikörper M7 und M31 wurden uns freundlicherweise vom Scripps Research Institute (La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Wir danken an dieser Stelle herzlich für die großzügige Zurverfügungstellung der Antikörper.

Tabelle 30: Probenzusammensetzung Abbildung 61

Spur	Probe	Antikörper
1	Sepharose-Bead-Adsorption 1:4 verdünntes Spenderplasma	kein Primärantikörper; nur Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
2	Sepharose-Bead-Adsorption 1:4 verdünntes Spenderplasma	Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK*
3	Sepharose-Bead-Adsorption 1:4 verdünntes Spenderplasma	Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
4	Sepharose-Bead-Adsorption 1:4 verdünntes Spenderplasma	Primärerantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
5	Sepharose-Bead-Adsorption 1:4 verdünntes Spenderplasma	HRP-gekoppelte polyklonale Kaninchen-anti-human-VWF

* Der Antikörper wurde schon einmal vorher für einen weiteren Western Blot genutzt.

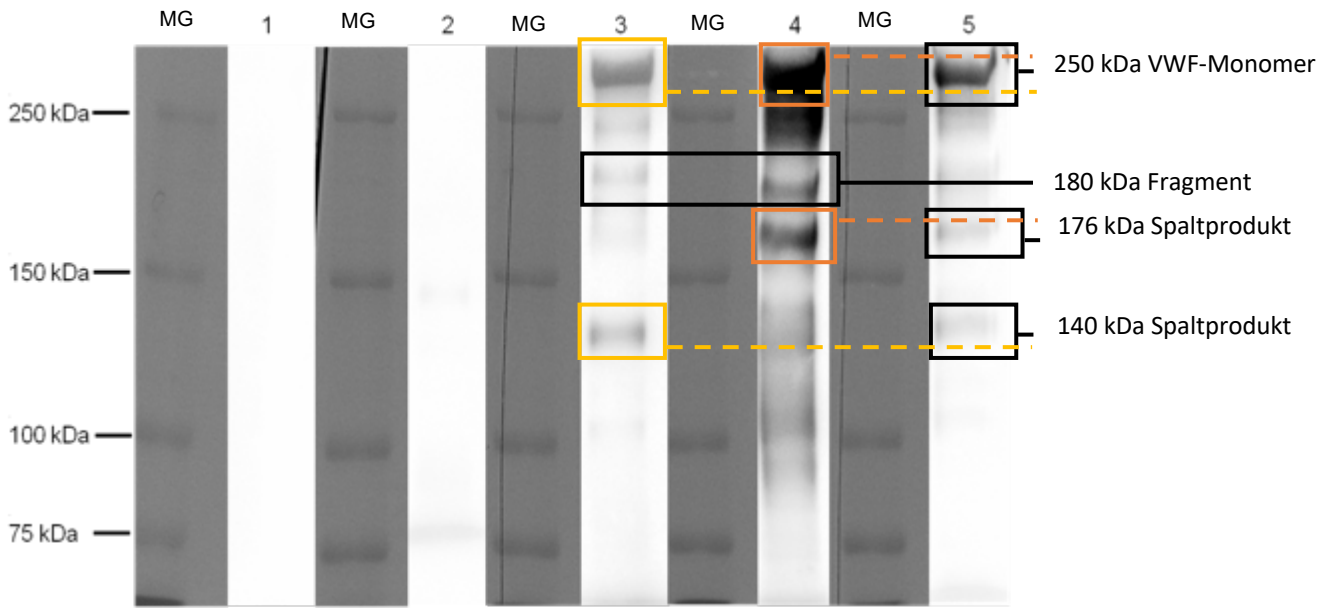

Abbildung 61: Fragmente des VWF nach Adsorption an Sepharose-Beads anhand der Antikörper M7 und M31, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 5,5s.

4.1.4 Untersuchung der Spaltung des VWF durch Plasmin

Die Spaltung des VWF durch Plasmin wurde schon von einzelnen Autoren beschrieben [106], [121]. Die nachfolgend beschriebenen Versuche dienten der Identifizierung und Detektierung von VWF-Spaltprodukten, die durch Plasmin generiert wurden. Gleichzeitig war es aber auch Ziel, VWF-Spaltprodukte, die durch proteolytische Spaltung durch Plasmin entstanden sind, von VWF-Spaltprodukten abzugrenzen, die durch eine proteolytische Spaltung durch ADAMTS13 entstanden sind.

4.1.4.1 Proteolytische Spaltung von rekombinantem und humanem VWF durch Plasmin über die Zeit

In einem ersten Versuch wurden 33,33 µg/ml rhVWF mit 0,5 µg/ml Plasmin in einem TBS-BSA-Puffer mit pH 7.4 bei 37°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots zu 30 µl des Ansatzes entnommen und anschließend wurden eine SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Es wurde 1 µg rhVWF pro Spur

aufgetragen. In Tabelle 31 sind noch einmal die einzelnen Konzentrationen sowie die pipettierten Volumina aufggeführt.

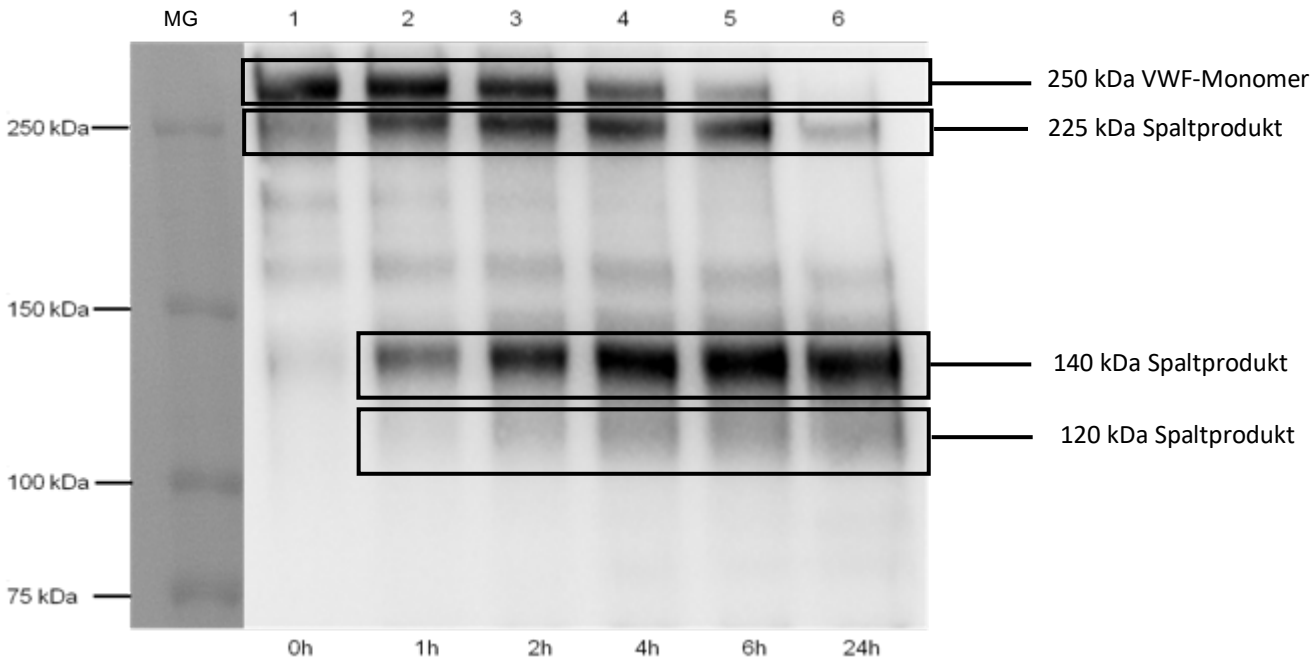

Abbildung 62: Proteolytische Spaltung von rekombinantem und humanem VWF durch Plasmin über die Zeit, 5% Polyacrylamidgel, Detektion mit HRP-markiertem Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 1,3s.

Tabelle 31: Ansatz proteolytische Spaltung des rhVWF durch Plasmin

Konzentration	**Volumen**
rhVWF 169 U/ml	29,586 µl
Plasmin (1,04 mg/ml)	0,721 µl
Pufferzusammensetzung	
TBS, 0,1% BSA, pH 7.4	1469,7 µl

In Abbildung 62 ist zu sehen, dass es über die Zeit zu einer Spaltung des VWF-Monomers bei 250 kDa kommt. Gleichzeitig beobachtet man, dass ein Spaltprodukt bei etwa 225 kDa auftritt (Spuren 2 bis 5), welches aber nach 24 Stunden fast komplett verschwunden ist. Ein zweites dominantes Spaltprodukt liegt etwa bei 140 kDa, welches über die Zeit zunimmt (Spuren 2-6). Ein drittes, ganz schwaches Spaltprodukt bei 120 kDa, ist ohne klare Zunahme über die 24 Stunden ebenfalls vorhanden.

4.1.4.2 Gegenüberstellung der unterschiedlichen Spaltfragmente des von Plasmin und von ADAMTS13 gespaltenen VWF

Berkowitz et al. beschrieben, dass Plasmin den VWF in ein 140 kDa und ein 176 kDa großes Spaltprodukt spaltet [106]. Durch die plasmininduzierte Spaltung ergaben sich also identisch große Spaltprodukte wie bei durch ADAMTS13 gespaltenem VWF.
Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine Probe mit den unter 4.1.3.6. beschrieben Bedingungen nach 24 Stunden Inkubation mit einer Probe aus den 4.1.5.1. beschriebenen Versuchsbedingungen nach 24 h Inkubation gemischt und anschließend mittels Western Blot analysiert. In Tabelle 32 ist das Auftragsschema des Western Blots aus Abbilung 63 aufgeführt.

Tabelle 32: Ansatz Mischung der proteolytische Spaltung des rhVWF durch Plasmin und der proteolytischen Spaltung durch ADAMTS13

Spur 1	rhVWF-Spaltung mittels ADAMTS13 nach 24 Stunden aus 4.1.3.6
Spur 2	Mischung rhVWF- Spaltung mittels ADAMTS13 nach 24 Stunden aus 4.1.3.6 und rhVWF- Spaltung mittels Plasmin nach 24 Stunden aus 4.1.5.1
Spur 3	rhVWF- Spaltung mittels Plasmin nach 24 Stunden aus 4.1.5.1

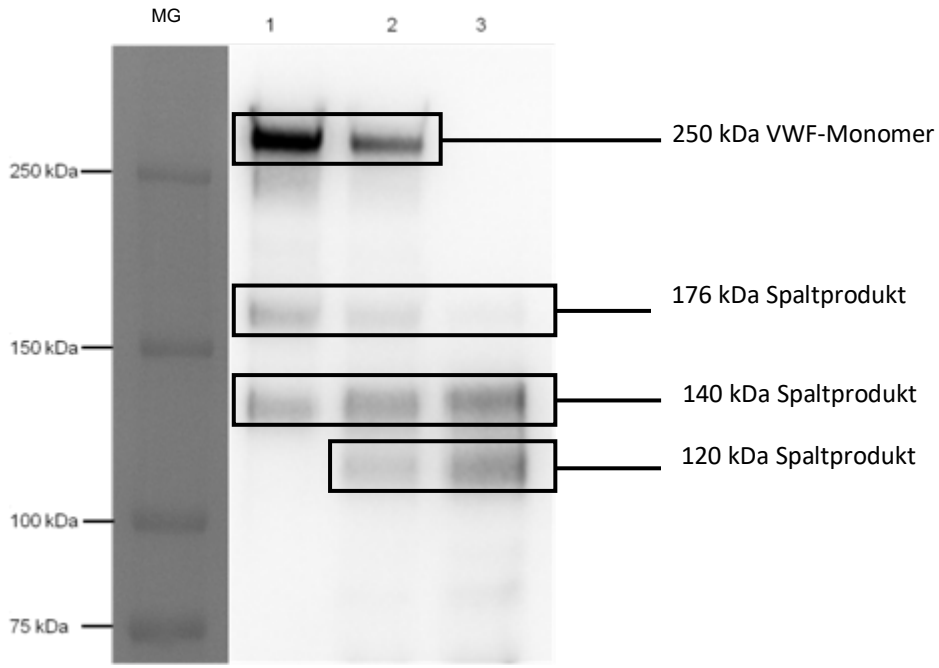

Abbildung 63: Mischung der proteolytischen Spaltung des rhVWF durch Plasmin und der proteolytischen Spaltung durch ADAMTS13, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 0,8s.

In Spur 1 erkennt man das VWF-Monomer bei 250 kDa, sowie die beiden durch ADAMTS13 gespaltenen VWF-Spaltprodukte bei 176 kDa und bei 140 kDa. In diesem Experiment erfolgte nur eine relativ schwache Spaltung des VWF. In Spur 3 sieht man kein VWF-Monomer bei 250 kDa, allerdings ein deutliches Spaltprodukt bei 140 kDa sowie ein Spaltprodukt bei 120 kDa. In Spur 2 ist eine 1:1 Mischung der Proben von Spur 1 und Spur 3 aufgetragen. Man erkennt das VWF-Monomer bei 250 kDa, ein VWF-Spaltprodukt bei 176 kDa, ein VWF-Spaltprodukt bei 140 kDa und ein VWF-Spaltprodukt bei 120 kDa. Man kann nicht unterscheiden, ob in Spur 2 die Bande bei 140 kDa durch ADAMTS13 oder durch Plasmin entstanden ist.

4.1.4.3 Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin, analysiert in einem 10% Polyacrylamid-Gel

Um weitere mögliche kleine VWF-Spaltprodukte, die durch eine proteolytische Spaltung von Plasmin entstanden sein könnten, zu untersuchen, wurde auch in einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel Proben aufgetragen (Abbildung 64). Der Western Blot wurde anschließend mit unterschiedlichen primären Antikörpern entwickelt (Tabelle 33). Die proteolytische Spaltung des rhVWF durch Plasmin wurde wie in 4.1.5.1 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass nicht mit 0,5 µg/ml Plasmin sondern mit 0,1 µg/ml Plasmin gespalten wurde. Die proteolytische Spaltung mit rhADAMTS13 wurde wie in 4.1.3.6 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 33: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin in einem 10% Polyacrylamid-Gel

Spur	Probe	Antikörper
1	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch Plasmin über 24 Stunden	HRP-gekoppelte polyklonale Kaninchen-anti-human-VWF
2	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch rhADAMTS13 über 24 Stunden	
3	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch Plasmin über 24 Stunden	Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
4	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch rhADAMTS13 über 24 Stunden	
5	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch Plasmin über 24 Stunden	Primärantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
6	Proteolytisch gespaltener rhVWF durch rhADAMTS13 über 24 Stunden	

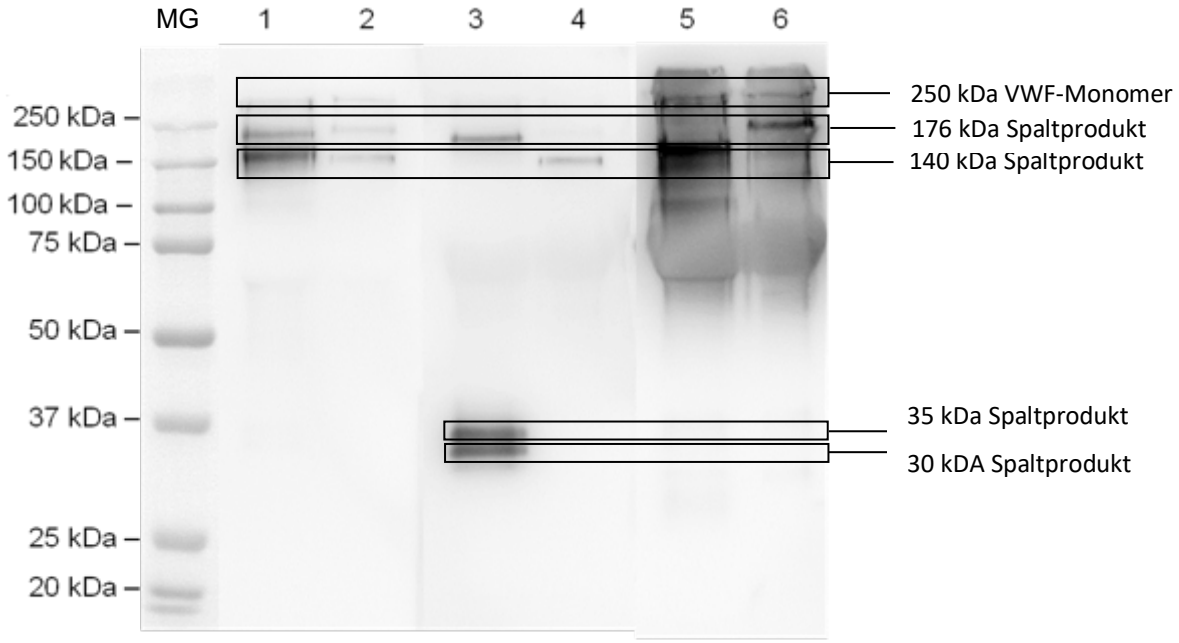

Abbildung 64: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin in einem 10% Polyacrylamid-Gel, Expositionszeit 4,5s.

In den Spuren 1 und 2 sowie 4, 5 bis 6 traten die zu erwartenden Bandenmuster bei 140 kDa und 176 kDa auf. In Spur 3 zeigte der M7 Antikörper zwei bis dahin nicht detektierte VWF-Spaltprodukte bei 35 und bei 30 kDa, die offensichtlich vom -terminalen Ende des VWF-Monnomers stammen. Anhand der Spuren zeigt sich in diesem Experiment, dass die 140 kDa- und 176 kDa-Fragmente von Plasmin und ADAMTS13 nicht identisch sind.

4.1.4.4 Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf

Um die proteolytische Spaltung des VWF durch Plasmin genauer zu untersuchen, wurde eine Spaltung von rhVWF im zeitlichen Verlauf durchgeführt. Ziel war es zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Ausmaß der proteolytischen Spaltung anhand der Bandendicke zu beurteilen, sowie mit den in 4.1.4.2 beschriebenen Antikörpern einzelne Spaltprodukte des rhVWF darzustellen. In einem Ansatz wurden 33,33 µg/ml rhVWF durch 0,1 µg/ml Plasmin bei 37°C in dem unter 4.1.5.1 beschrieben Puffer gespalten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots mit jeweil 1 µg VWF entnommen und anschließend eine SDS-PAGE sowie ein Western Blot durchgeführt. Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt. Die densitometrische Auswertung ist

in den Abbildungen 69-71 gezeigt. Exemplarisch zeigt Abbildung 65 einen Blot dieses Versuchs. Parallel dazu wurden noch drei weitere Western Blots erstellt und mit den Antikörpern M7 (Abbildung 66), M31 (Abbildung 67) und anti-VWF-A2-AK (Abbildung 68) erstellt.

Tabelle 34: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf

Abbildung 66		Abbildung 67		Abbildung 68		Abbildung 69	
HRP-gekoppelte polyklonale Kaninchen-anti-human-VWF		Primärantikörper M7 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK		Primärantikörper M31 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK		Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK	
	Abnahme nach		Abnahme nach		Abnahme nach		Abnahme nach
Spur 1	0 h	Spur 1	0 h	Spur 1	0 h	Spur 1	0 h
Spur 2	2 h	Spur 2	2 h	Spur 2	2 h	Spur 2	2 h
Spur 3	4 h	Spur 3	4 h	Spur 3	4 h	Spur 3	4 h
Spur 4	6 h	Spur 4	6 h	Spur 4	6 h	Spur 4	6 h
Spur 5	24 h	Spur 5	24 h	Spur 5	24 h	Spur 5	24 h
Spur 6	*	Spur 6	*	Spur 6	*	Spur 6	*

*Plasmatische ADAMTS13 induzierte Spaltung von Willfact® mit der unter 4.1.2.1 beschriebenen Bedingungen nach 6h Spaltung von Proband A

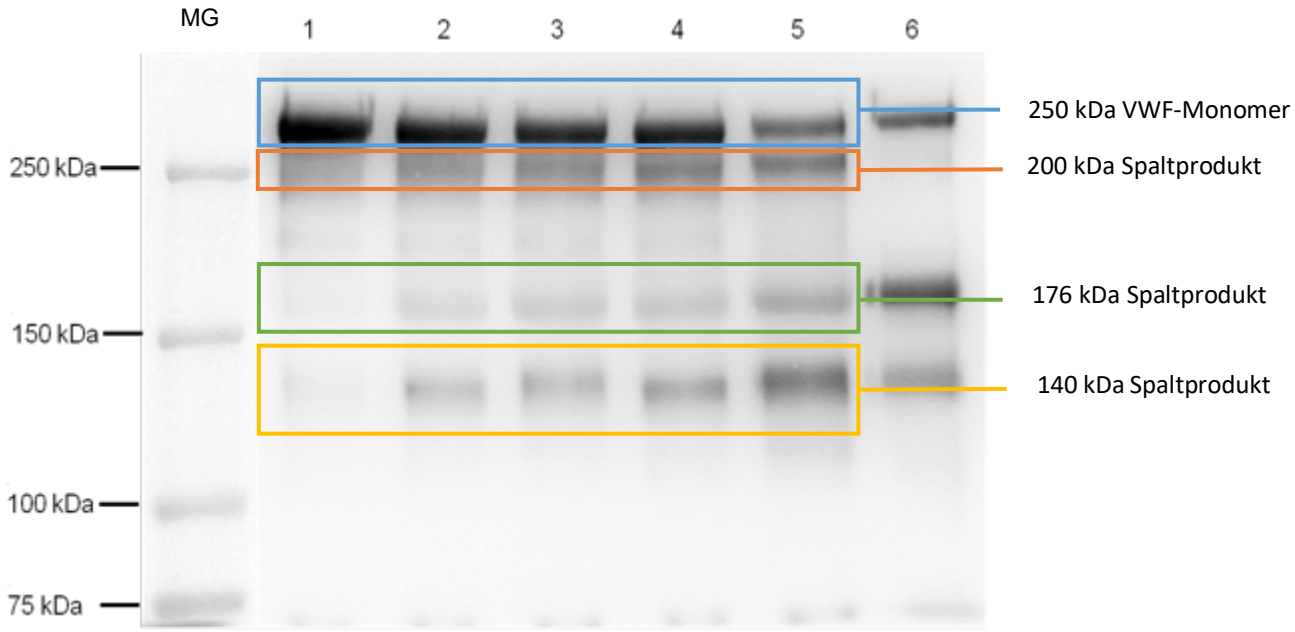

Abbildung 65: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primären anti-VWF-AK, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3,3s.

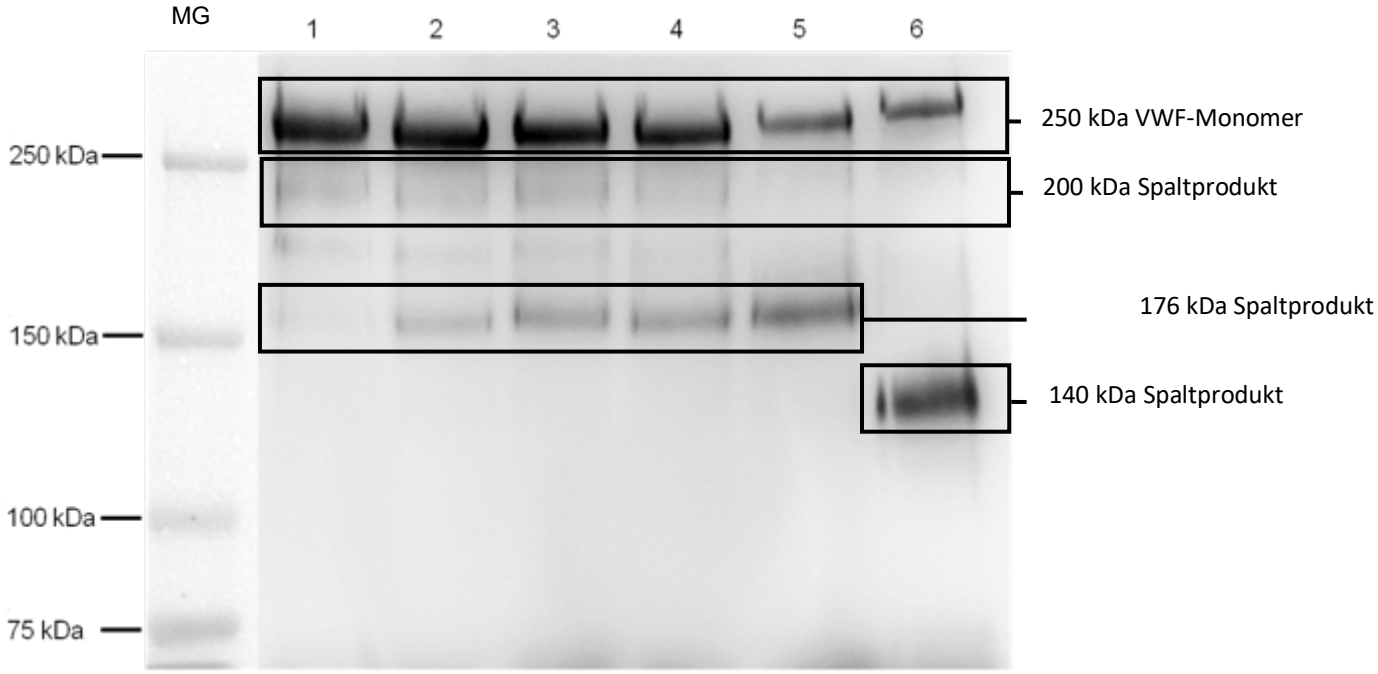

Abbildung 66: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem M7-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK Antikörper, Expositionszeit 2

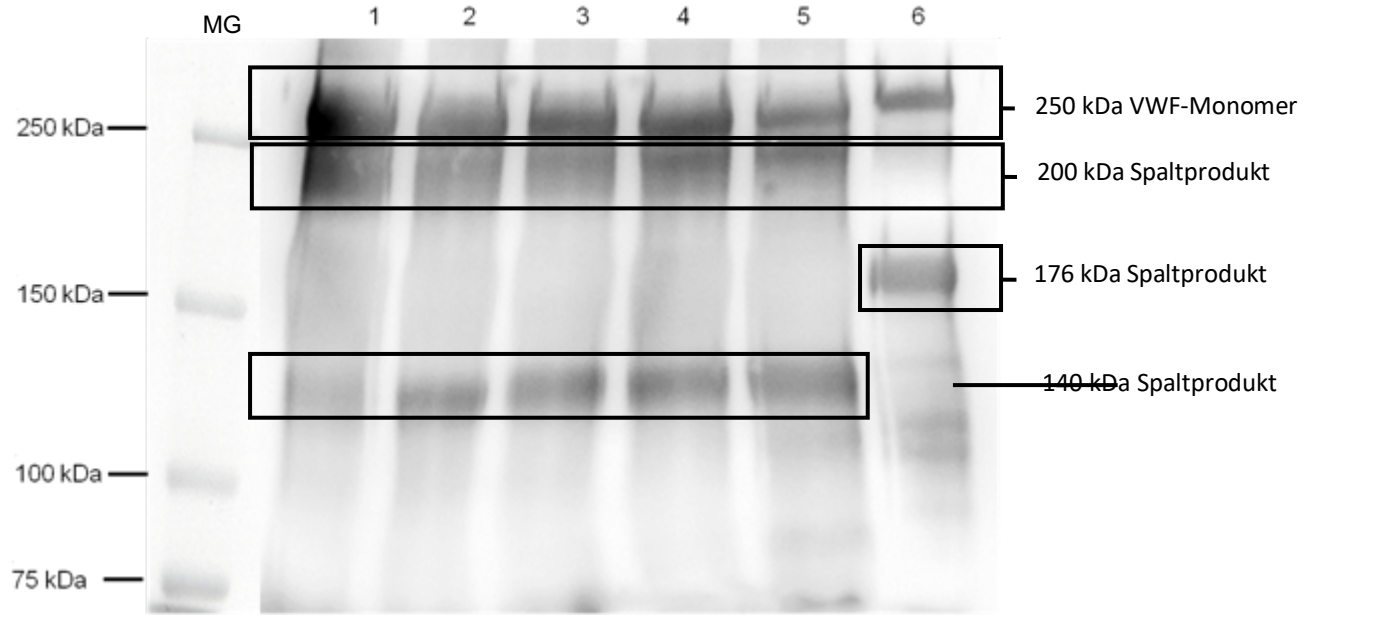

Abbildung 67: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem M31-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, Expositionszeit 6,6s.

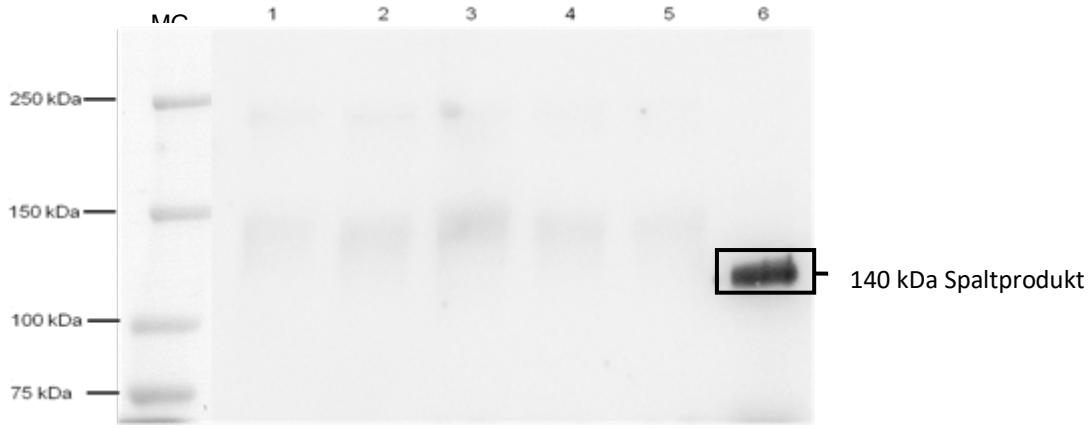

Abbildung 68: Proteolytische Spaltung von rekombinantem VWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf mit primärem anti-VWF-A2-AK, 5% Polyacrylamidgel, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, Expositionszeit 30s.

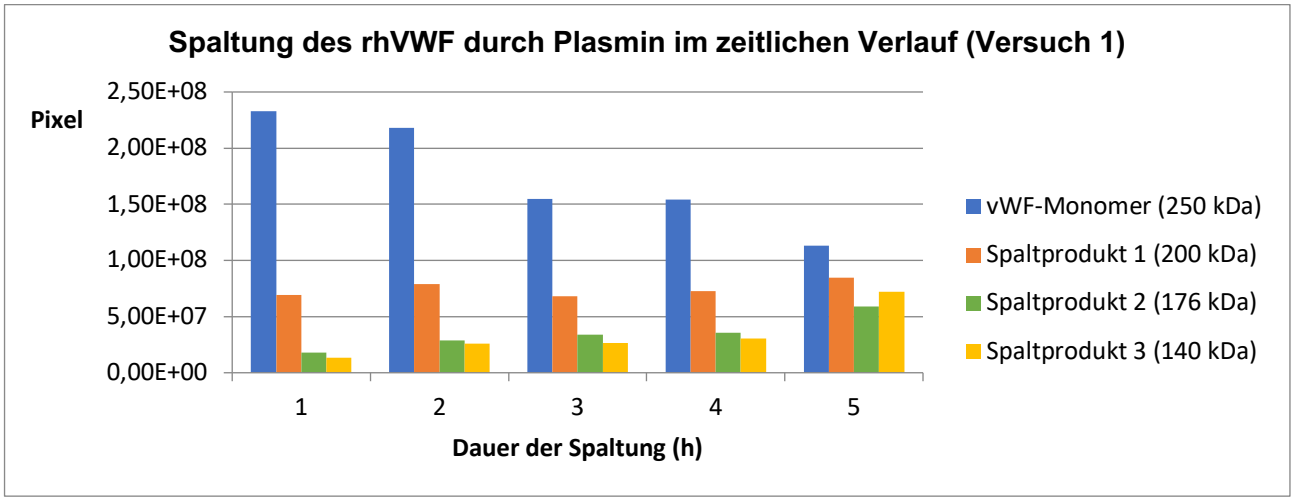

Abbildung 69: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 1/3)

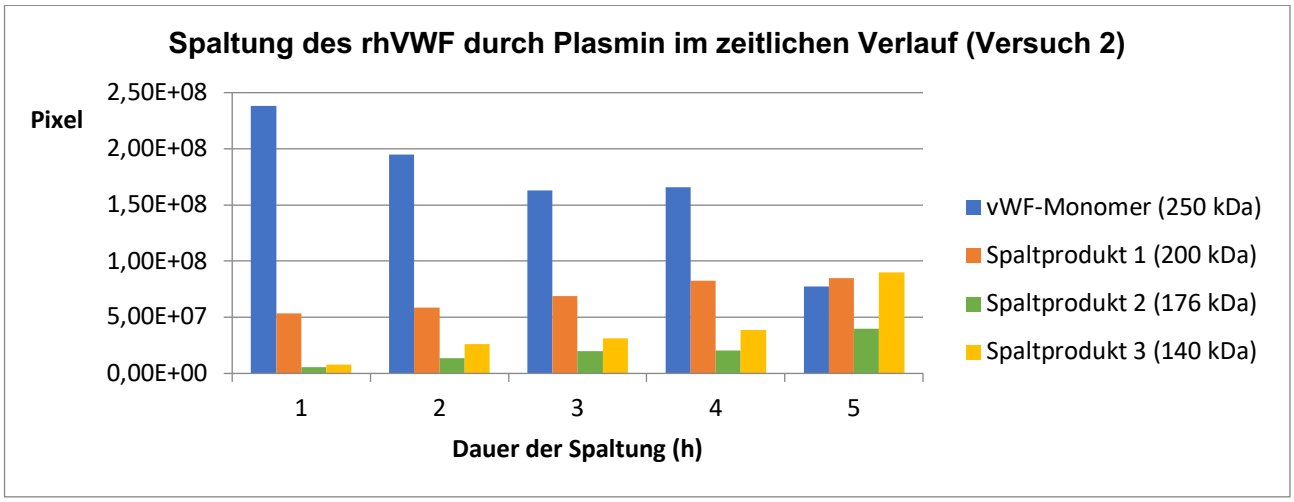

Abbildung 70: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 2/3)

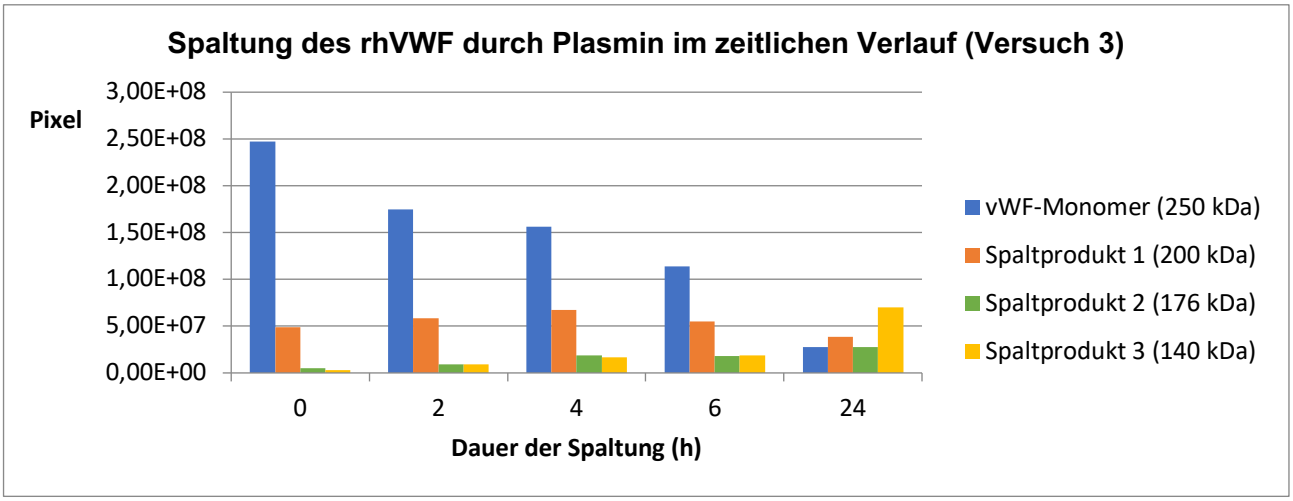

Abbildung 71: Densitometrische Auswertung der Spaltung des rhVWF durch Plasmin im zeitlichen Verlauf (Versuch 3/3)

In den Abbildungen 65-68 zeigen sich verschiedene Spaltprodukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In Abbildung 65 erkennt man in den plasmingespaltenen Proben, dass es zu einer Abnahme des 250 kDa VWF-Monomers kommt. Es treten Spaltprodukte bei 200 kDa, 176 kDa und bei 140 kDa auf. Je länger der rhVWF durch Plasmin gespalten wird, desto stärker wurde die 140-kDa-Bande und gleichzeitig nahm die Intensität der 176 kDa-Band ab. Es zeigt sich auch, dass die Spaltprodukte des durch ADAMTS13 gespaltenen in Spur 6 VWF bei 140 kDa und 176 kDa auf nahezu gleicher Höhe liegen, wie die Spaltprodukte, welche durch Plasmin entstanden sind. In Abbildung 66 sieht man hauptsächlich eine Zunahme des bei 176 kDa liegenden rhVWF-Spaltproduktes, das durch die Spaltung von Plasmin entstanden ist. In Spur 6 zeigt sich demgegenüber mit dem M7-Antikörper ein Spaltprodukt bei 140 kDa, das durch eine ADAMTS13 induzierte Spaltung entstand. In Abbildung 67 sieht man eine Zunahme des 200 und 140 kDa liegenden rhVWF-Spaltproduktes, das durch die Spaltung von Plasmin entstanden ist. Gleichzeitig sieht man, dass der eingesetzte M31-Antikörper das ADAMTS13 induzierte Spaltprodukt bei 176 kDa sichtbar macht. In Abbildung 68 zeigt sich lediglich eine Bande in der ADAMTS13 induzierten proteolytischen Spaltung des VWF bei 140 kDa. Der Primärantikörper anti-VWF-A2-AK zeigt nur hier eine Bande an, nicht aber bei Proben, in denen der rhVWF durch Plasmin gespalten wurde.

In den Abbildungen 69-71 ist die Pixeldichte des rhVWF im zeitlichen Verlauf angezeigt. Es wurde bei allen Auswertungen der Blots zur Entwicklung der primäre HRP-markierten Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper benutzt. Es zeigt sich, dass es in allen drei Versuchen zu einer Abnahme des 250 kDA Monomers durch eine

Plasmin-induzierte Spaltung über die Zeit kommt. Je länger die Spaltung dauert, desto mehr des 250 kDA rhWVF-Monomers wird gespalten. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der Plasmin-induzierten rhVWF-Spaltprodukte bei 200 kDa, 176 kDa und bei 140 kDa.

4.2 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen

4.2.1 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit erworbenem von-Willebrand-Syndrom (VWS) und erworbener thrombotisch thrombozytopenischer Purpura (TTP) im akuten Schub sowie in Remission

Bei verschiedenen Patienten wurden eine Sepharose-Bead-Adsorption nach dem in 4.1.1.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Probe in Spur 3 in Abbildung 72 wurden auf Grund des VWF:Ag von 117% 1:4 mit TBS-Proteinaseinhibitor-Puffer pH 7.4 verdünnt. Die Proben aus Abbildung 75 wurden aufgrund geringer Probenmengen 1:3 mit TBS-Proteinaseinhibitor-Puffer pH 7.4 verdünnt und es wurde eine Adsorption mit 750 µl anstatt mit 1000 µl durchgeführt. Es wurden Plasmen von Patienten untersucht, die an einer erworbenen Form der TTP erkrankt waren, Plasmen von Patienten, die an einem erworbenen von-Willebrand-Syndrom litten, als auch an der genetischen Variante des von-Willebrand-Syndroms Typ 2A. Ziel war es Unterschiede in der proteolytischen Spaltung des VWF im Vergleich zu gesunden Probanden zu erkennen und diese zu beschreiben. Die Probenverteilung aus Abbildung 72 ist in Tabelle 35 und die Probenverteilung von Abbildung 73 in Tabelle 36 aufgeführt. Darüberhinaus sind in den Tabellen 35 und 36 die jeweilige Erkrankung, die, wenn sie vorlagen, durchgeführten genetischen Untersuchungen mit der jeweiligen Mutation, sowie die klinisch beschriebenen Symptome.

Tabelle 35: Adsorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen aus Abbildung 72

Spur	Nummer	Beschreibung	Genetik	Beschriebene klinische Symptome
1	NHP1	Gesundes Probandenplasma	-	-
2	P1_VWS	Von Willebrand Krankheit Typ 2A, VWF:AG 111%	Exon 28:c.4825G>A, p.Gly1609Arg, het.	Nasenbluten, Hämatome, Zahnfleisch-blutungen, Nachbluten nach Zahnextraktion
3	P3_VWS	Erworbenes VWS bei myeloproliferativer Neoplasie, VWF:AG 117%	Keine Mutation	Unnklare Befundkonstellation: Verdacht auf Essenzielle Thrombozythämie, eine Polyzythämia Vera mit Leukozytose wurde noch nicht ausgeschlossen, keine Blutungen
4	P6_VWS	Erworbenes VWS bei monoklonaler Gammopathie IgG Typ Kappa, VWF:AG 15%	Keine Mutation	Nachblutung nach kleineren Wunden, nach OP, Zahnbehandlung sowie Zahnfleischblutungen
5	NHP2	Gesundes Probandenplasma	-	-
6	P1_TTP	Erworbene TTP, akuter Schub, ADAMTS13-Aktivität <1%	-	-
7	P2_TTP	Erworbene TTP, in Remission, ADAMTS13-Aktivität <10,5%	-	-
8	P3_TTP	Erworbene TTP, Schwangerschaft bei Probenentnahme, ADAMTS13-Aktivität <1%	-	-
9	NHP3	Gesundes Probandenplasma	-	-

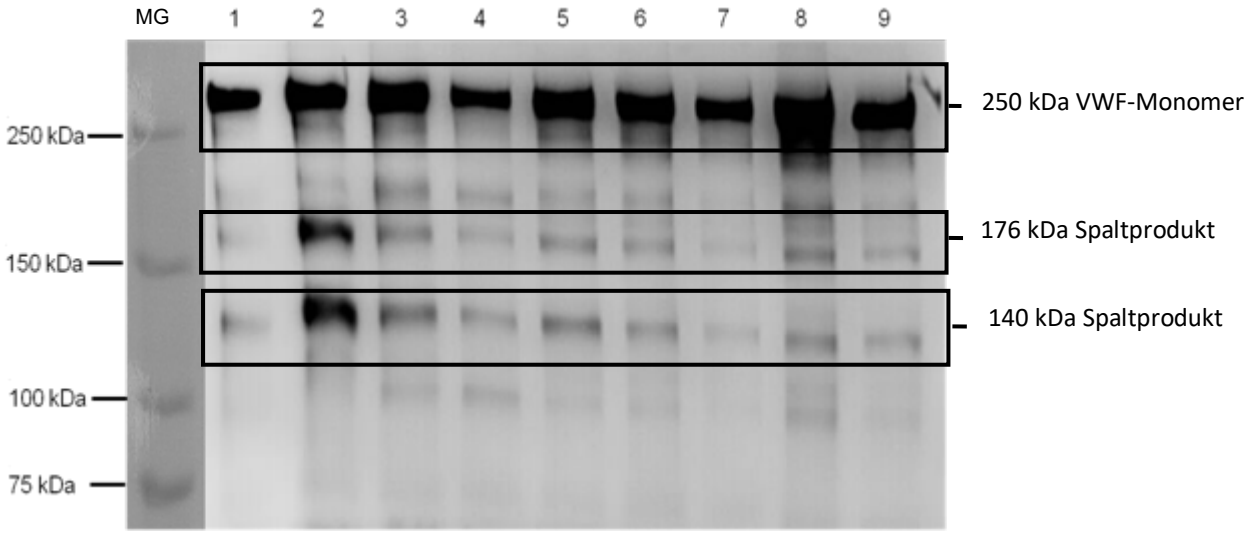

Abbildung 72: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit erworbenem von-Willebrand-Syndrom und erworbener thrombotisch thrombozytopener Purpura im akuten Schub sowie in Remission, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper

In Abbildung 72 erkennt man im Vergleich zu den Kontrollen „Normal human plasma“ (NHP) 1, NHP2 und NHP3 eine deutliche Zunahme der Bandenintensität in Spur 2 beim Patienten P1_VWS, welcher an einem VWS Typ A2 erkrankte. Sowohl bei 140 kDa als auch bei 176 kDa ist eine deutliche Zunahme der Bandenintensität zu sehen. Die Patientin P3_VWS und P6_VWS mit erworbenen VWS in Abbildung 73 zeigen dagegen vergleichbare Bandenmuster wie die Kontrollen NHP1, NHP2 und NHP3. Die TTP-Patienten P1_TTP und P3_TTP, im Schub einer TTP, zeigen eine stärkere Intensität der Banden an als die Patientin P2_TTP in Remission der TTP. Das

Bandenmuster des TTP-Patienten im aktiven Schub lässt sich aber nicht sonderlich von denen der Kontrollen NHP1, NHP2 und NHP3 unterscheiden. Der Patient P2_TTP in Remission der TTP dagegen zeigt eine eher verminderte Proteolyse des VWF anhand des Bandenmusters.

Tabelle 36: Adsorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen aus Abbildung 73

Spur	Nummer	Beschreibung	Genetik	Klinik
1	NHP1	Gesundes Probandenplasma	-	-
2	P4_VWS	VWS Typ 2A (rezessiv), VWF:AGG (%): 13	Exon28:c.3686T>G, p.Val1229Gly; c.3692A>C,p.Asn1231Thr, het., Exon 28: c.4120C>T, p.Arg1374Cys, het.	keine Informationen
3	P5_VWS	VWS Typ 2A, VWF:AG (%): 32	Exon 28: c.4120C>T, p.Arg1374Cys, het.	Nasenbluten, Hämatome, Zahnfleischbluten, Pharyngeal-hämatom, Muskeleinblutungen
4	P6_VWS	aVWS bei monoklonaler Gammopathie IgG Typ Kappa, VWF:Ag (%): 15	Keine Mutation	Nachblutung nach kleineren Wunden, OP, Zahnbehandlung sowie Zahnfleischblutungen
5	NHP2	Gesundes Probandenplasma	-	-
6	P1_TTP	Erworbene TTP, akuter Schub, ADAMTS13-Aktivität <1%	-	-
7	P2_TTP	Erworbene TTP, in Remission, ADAMTS13-Aktivität <10,5%	-	-
8	P3_TTP	iTTP, Schwangerschaft bei Probenentnahme, ADAMTS13-Aktivität <1%	-	-
9	NHP3	Gesundes Probandenplasma	-	-

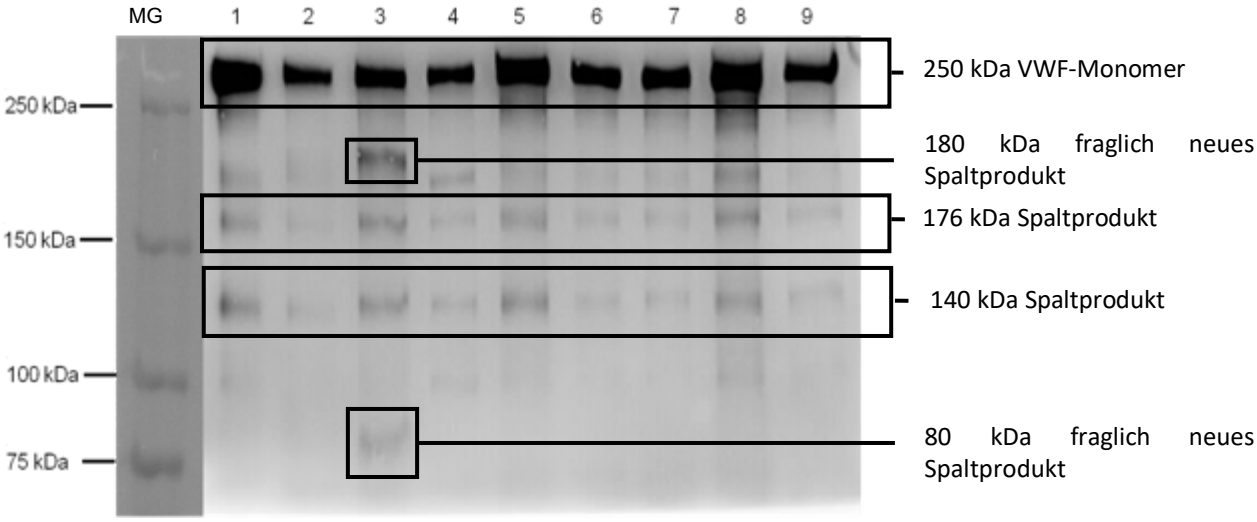

Abbildung 73: Absorption von Patientenplasmen mit erworbener TTP, erworbenem VWS, VWS Typ 2A und gesunden Probanden-Plasmen, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 10s.

In Abbildung 73 zeigt sich bei den Patienten P4_VWS, P5_VWS und P6_VWS keine verstärkte Proteolyse des VWF anhand des Bandenmusters im Western Blot. Bei Patient P5_VWS zeigt sich eine verstärkte Bande bei etwa 180 kDa und eine Bande bei etwa 80 kDa, die weder in den Kontrollen noch in den anderen Patienten beobachtet werden konnte. Es ist allerdings anzumerken, dass das Plasma von Patient P5_VWS bei den Versuchen selbst nach erneuter Zentrifugation eine Trübung im Sinne einer milden Ausflockung zeigte. Es ist daher nicht von sicheren Ergebnissen auszugehen und bedarf weiterer Untersuchungen, um eine definitive Aussage bezüglich „neuer“ VWF-Fragmente machen zu können.

4.2.2 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei hereditärer TTP in Remission

Das Plasma einer Patientin mit hereditärer TTP wurde untersucht. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war die ADAMTS13 Aktivität vermindert bei 10,8 %. Klinisch befand sich die Patientin zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Remission. 350 µl Patientenplasma wurden mit 1050 µl TBS-Proteinaseinhibitor-Puffer pH 7.4 1:4 verdünnt und anschließend wurden eine Adsorption mit insgesamt vier Proben nach dem beschriebenen Protokoll aus 4.1.1.3 durchgeführt. Dabei wurden an 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B 350µl 1:4 verdünnntes Plasma adsorbiert. Mit der Plasmamenge von 350 µl waren vier Adsorptionen möglich. Anschließend wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Es wurden von den Blots zwei Aufnahmen bei unterschiedlich langen Expositionszeiten gemacht. Ziel war es mögliche Spaltprodukte zu detektieren, die in geringer Konzentration vorliegen und erst bei höheren Expositionszeiten detektierbar wären. Tabelle 37 beschreibt die eingesetzten Antikörper in den jeweiligen Spuren von Abbildung 74 und Abbildung 75.

Tabelle 37: Hereditäre TTP in Remission Abbildung 75 und 76

Spur	Eingesetzter Antikörper
1	primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper
2	Primärer Antikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
3	Primärer Antikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK
4	Primärer Antikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK

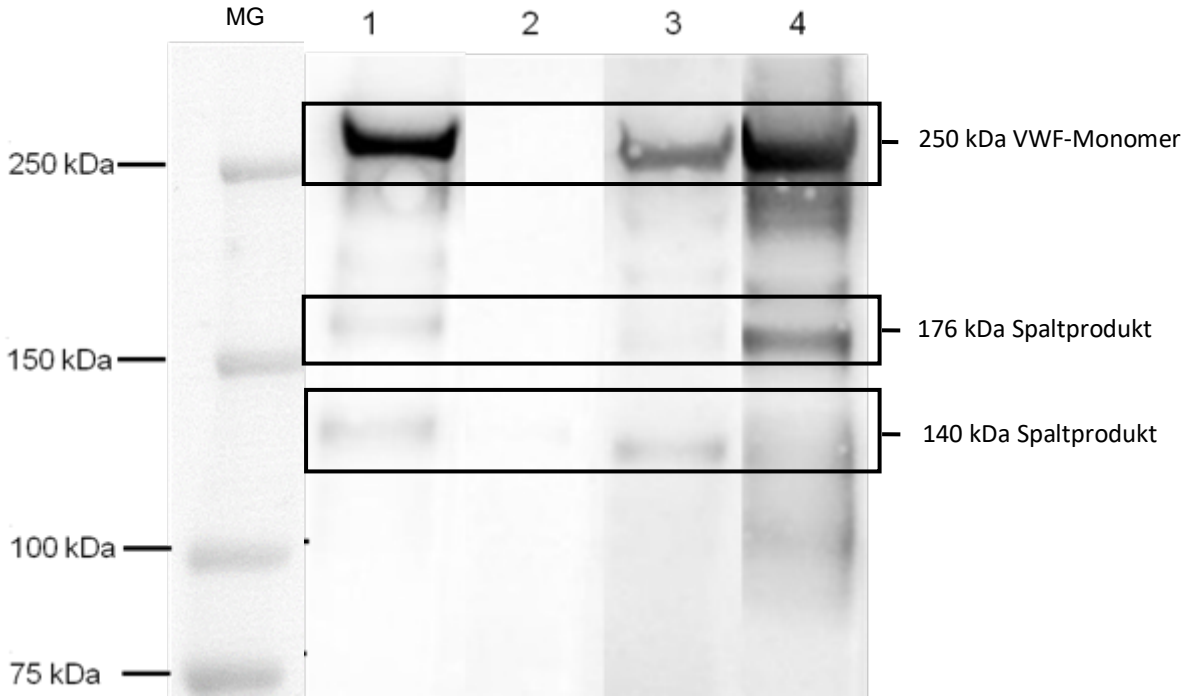

Abbildung 74: Patient mit hereditärer TTP in Remission mit niedriger Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-VWF-Antikörper, Expositionszeit 1,2s.

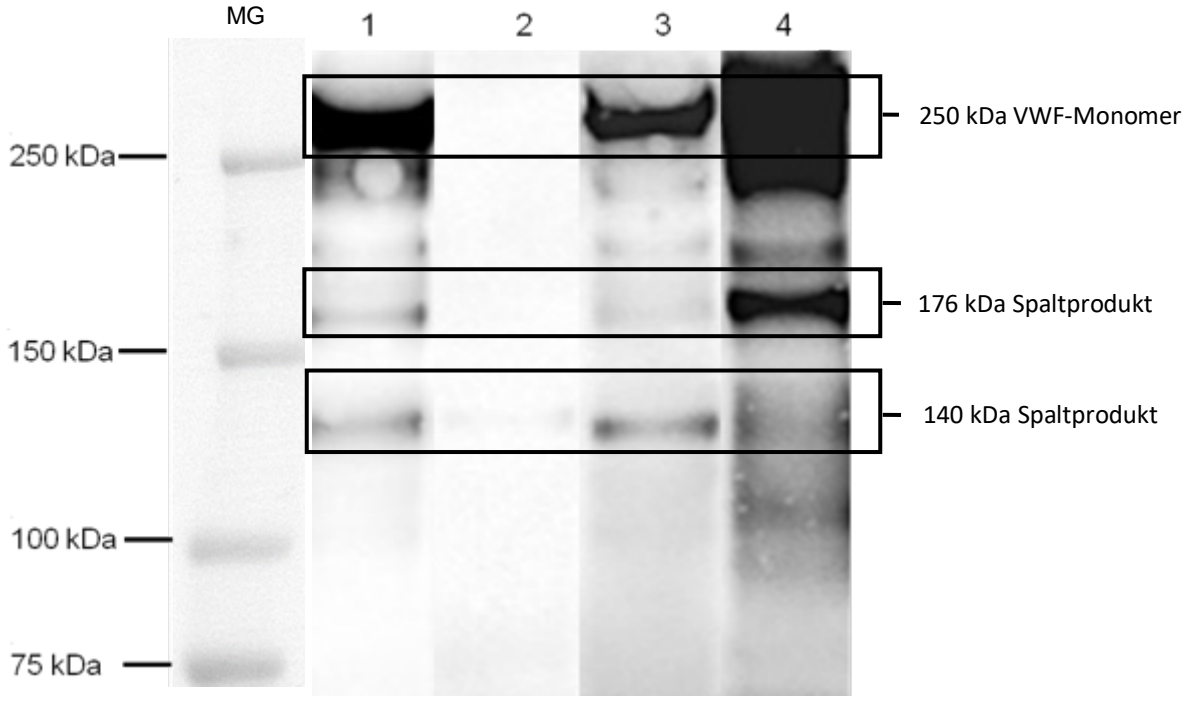

Abbildung 75: Patient mit hereditäre TTP in Remission mit hoher Expositionszeit, 5% Polyacrylamidgel, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, Expositionszeit 3,4s.

Es zeigen sich in Spur 1 von Abbildung 74 und 75 ein Bandenmuster, das eine Bande bei 250 kDa, eine bei 176 kDa und eine bei 140 kDa zeigt. In Spur 2 zeigt sich in Abbildung 74 keine Bande. Erst bei einer stärkeren Belichtung in Abbildung 75 zeigt sich bei 140 kDa eine diskrete Bande. Der eingesetzte Primärantikörper anti-VWF-A2-Antikörper wurde zuvor schon mal für eine Detektion eingesetzt. In Spur 3 zeigt sich sowohl in Abbildung 74 als auch in Abbildung 75 neben der 250 kDa Bande eine weitere deutliche Bande bei 140 kDa, die auf das N-terminale Stück des VWF hindeutet, während in Spur 4, neben den 250 kDa Monomer sich eine deutliche Bande bei 176 kDa anfärbt, die auf das C-terminale Ende hindeutet. Es zeigt sich insgesamt ein Muster, das trotz verminderter ADAMTS13-Aktivität auf eine ADAMTS13 induzierte Spaltung des VWF hindeutet.

4.2.3 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS

Es wurden verschiedene Patienten mit einem plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS untersucht. Die Patienten wurden 2016 von Dicke et al. untersucht und beschrieben [78]. Dabei wurden unterschiedliche Pathomechanismen für ein akquiriertes VWS beschrieben. Auf die einzelnen, von Dicke et al. beschriebenen Mechanismen wird in 5.3.4 eingegangen. Es wurden mit den beschriebenen Patientenplasmen Sepharose-Bead-Adsorptionen durchgeführt. In Tabelle 38 ist die Probenverteilung der Western Blots aus den Abbildungen 76-79 beschrieben, sowie das jeweilige VWF:AG, die jeweilige Erkrankung, die Plasmamultimere und das Verdünnungsverhältnis der Probe bei der Probenadsorption. Die Probenbezeichnung der Patienten richtet sich nach der jeweiligen Beschreibung aus der Originalveröffentlichung von Dicke et al.

Tabelle 38: Plasmazelldyskresie-assoziierte erworbene VWS aus Abbildungen 76-79

Spur	Name	VWF-Ag (%)	Erkrankung	VWS-Plasma multimere	Verdünnung
1	Patient 6	204	Multiples Myelom	Normal	1:4 Verdünnung 200 µl Plasma + 600 µl TBS-Puffer pH 7.4 mit Universal Proteaseinhibitor
2	Patient 5	329	Multiples Myelom und AL-Amyloidose	Typ 2	
3	Patient 1	12	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz	Typ 1 (schwer)	
4	Normalplasma	102,7	-		

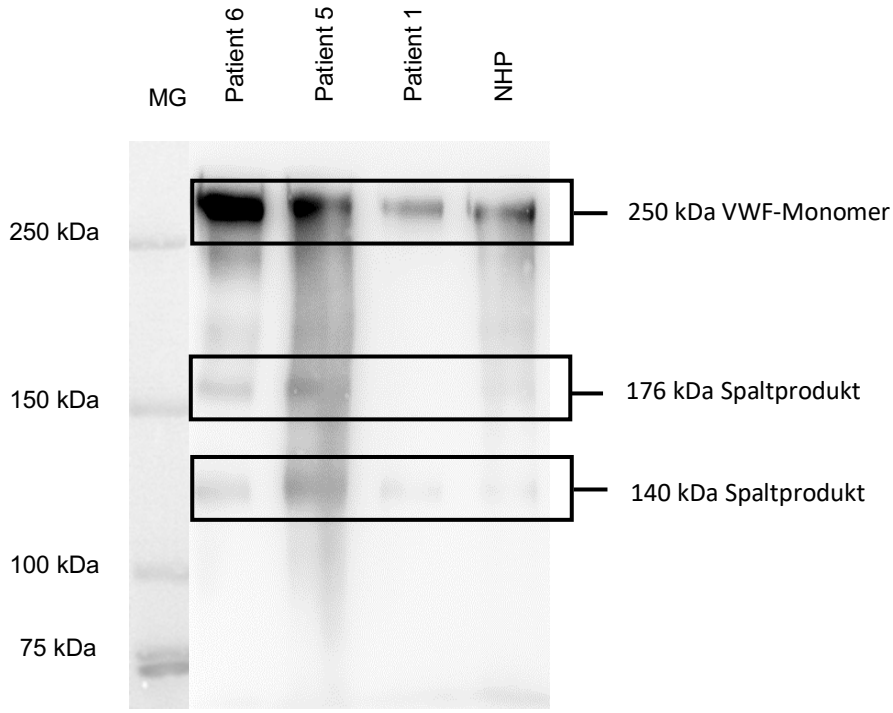

Abbildung 76: Untersuchug des VWF und seiner Spaltprodukte Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primären anti-VWF-AK, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 6s.

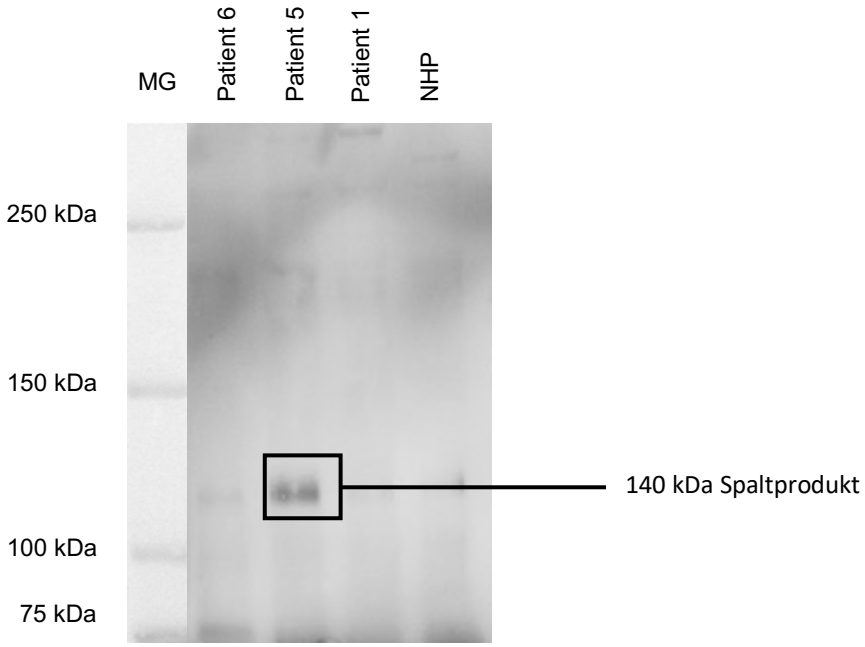

Abbildung 77: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem anti-VWF-A2-AK, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Exposition 50s

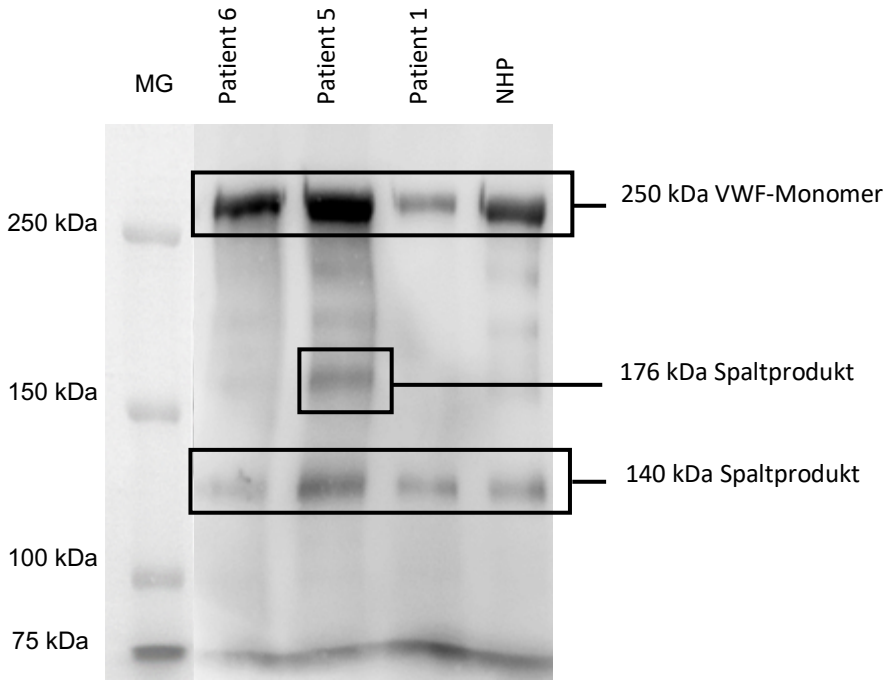

Abbildung 78: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M7-Antikörper, Primärantikörper M7 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 10s

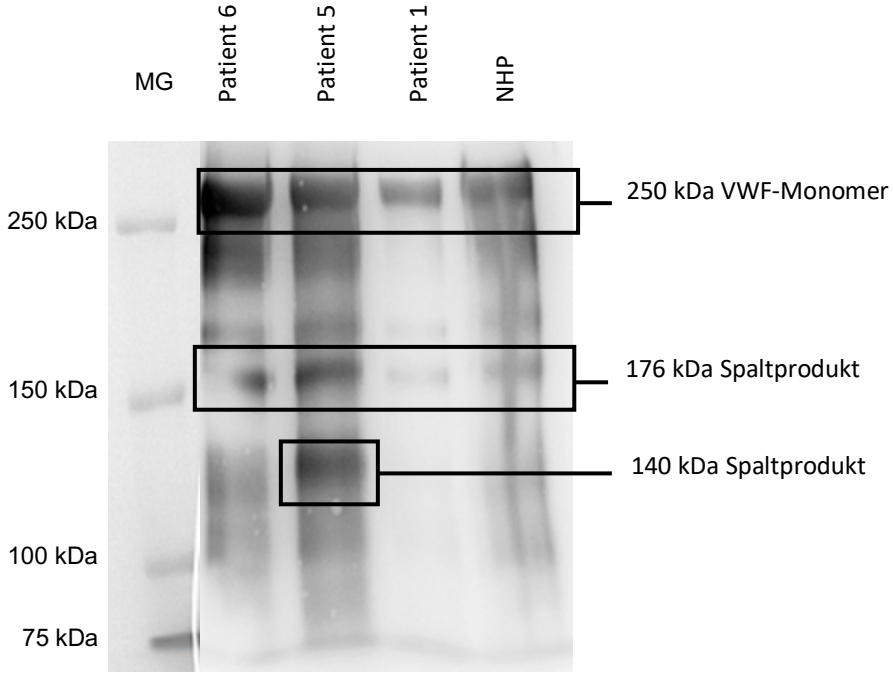

Abbildung 79: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M31-Antikörper, Primärantikörper M31 antibody, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 1s

In den Abbildungen 76-79 zeigt sich bei den Patienten in den Spuren 1 und 3 ein gleiches Bandenmuster wie bei der Kontrolle in Spur 4. Ausnahme bildet Patient 5 in Spur 2. Hier zeigen sich in Abbildung 78 und 79 Banden, die weder bei den Patienten 1 und 3 noch bei der Kontrolle zu sehen sind. Während in Abbildung 78 eine deutliche Bande bei 176 kDa zu sehen ist, zeigt sich in Abbildung 79 eine zusätzliche Bande bei 140 kDa. Patient 5 zeigt auch eine deutliche Bande bei 140 kDa in Abbildung 77.
Eine weitere Plasmaprobe des Patienten 5 wurde untersucht. Zwischen dem Abnahmezeitpunkt der ersten untersuchten Probe und der zweiten untersuchten Probe lagen mehrere Jahre. Der Patient 5 hatte immer noch eine erhöhte Konzentration an Plasmin-Antiplasmin-Komplexen in seinem Blut. Es wurde eine Adsorption mit 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B und 125 µl des 1:8 verdünnten Plasmas nach in 4.1.1.3 beschriebenem Protokoll durchgeführt. In den Spuren 1, 2 und 4 der Abbildungen 80 bis 83 sind Plasmen von gesunden Kontrollspendern aufgeführt. In Spur 3 der Abbildung 81 bis 83 ist das Plasma des Patienten 5 aufgetragen. In Abbildung 83 ist eine Adsorption des Patienten 5 gezeigt, bei dem der Western Blot mit einem Primärantikörper anti-VWF-A2-AK und einem Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK gefärbt wurde.

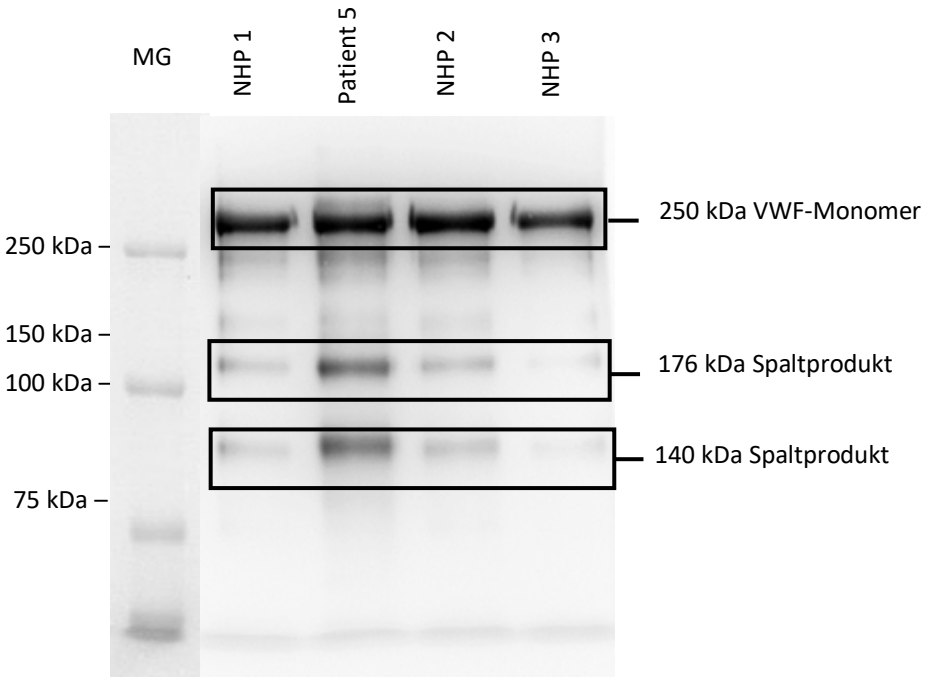

Abbildung 80. Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primären anti-VWF-AK, primärer Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s

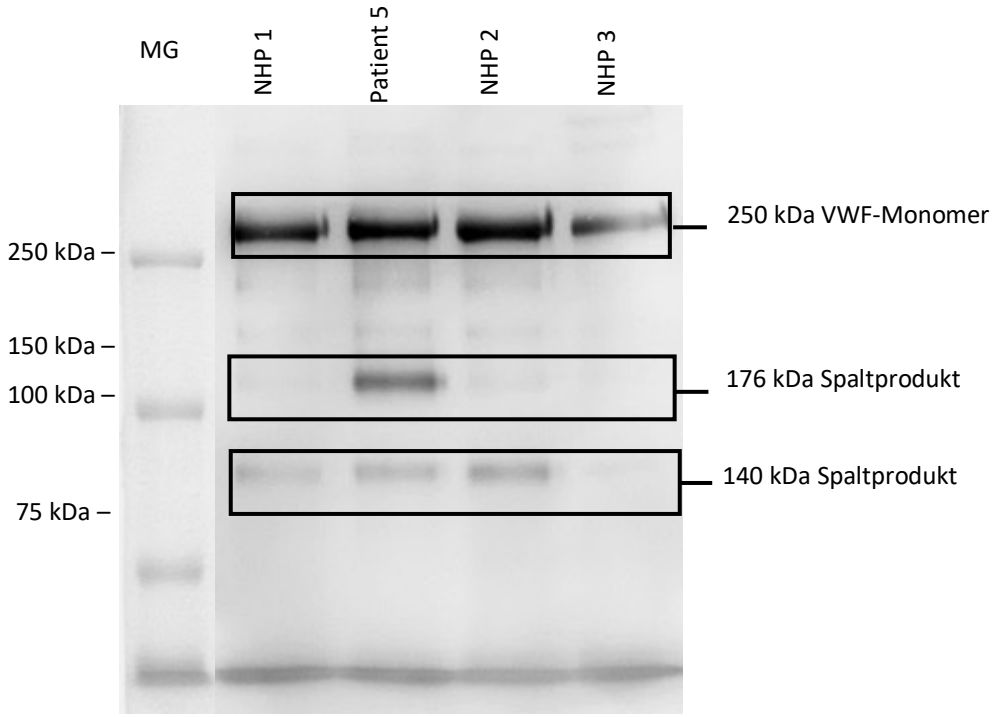

Abbildung 81: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M7-Antikörper, Primärantikörper M7 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s

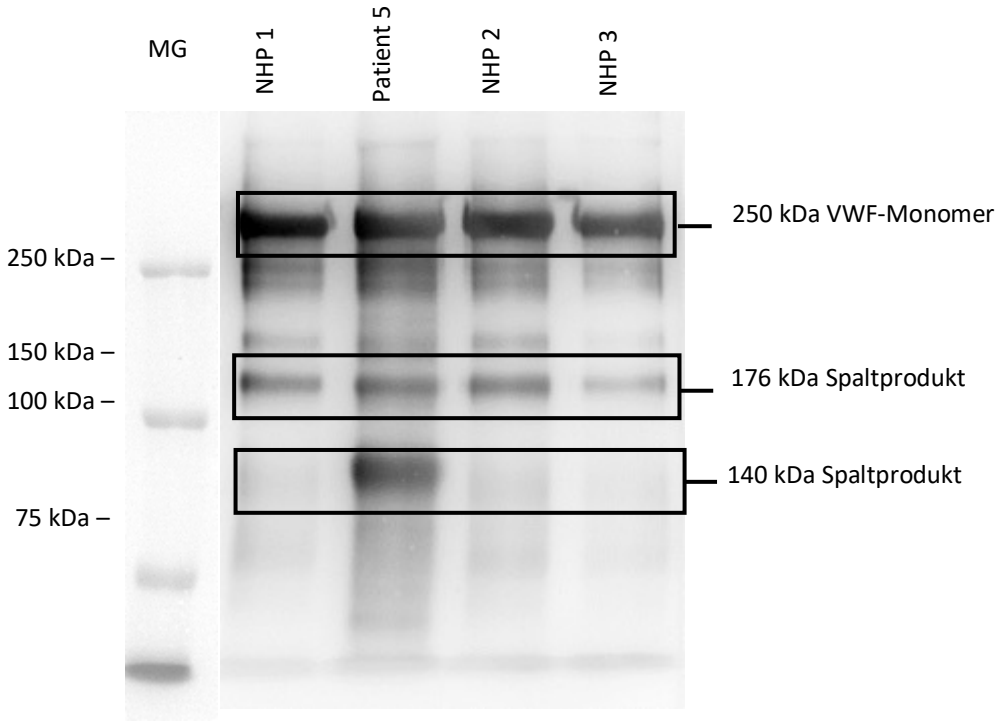

Abbildung 82: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem M31-Antikörper, Primärantikörper M31 antibody Ruggeri, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 5,3s

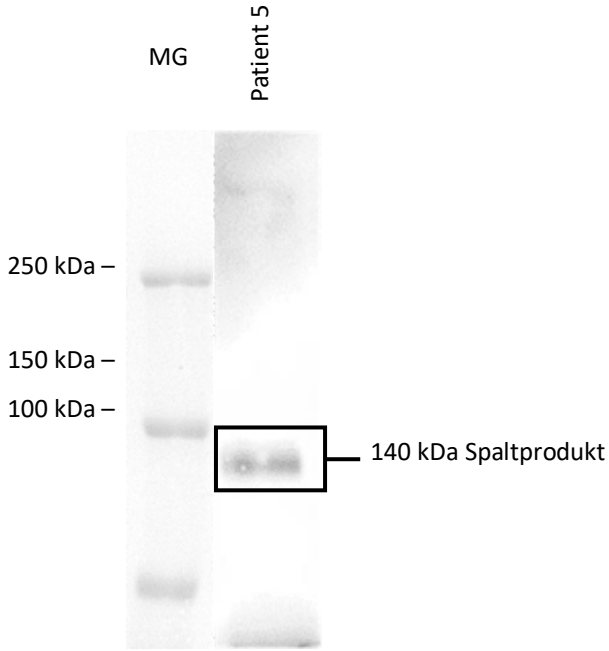

Abbildung 83: Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patient 5 mit plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS mit primärem anti-VWF-A2-AK, Primärantikörper anti-VWF-A2-AK, Sekundärantikörper HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK, 5% Polyacrylamidgel, Expositionszeit 300s.

In den Abb. 80 bis 83 zeigt sich, dass Patient 5 auch nach mehreren Jahren immer noch eine veränderte Spaltung des VWF im Vergleich mit Kontrollprobanden hat. Anhand von Abbildung 83 zeigt sich, dass eine ADAMTS13-induzierte Spaltung des VWF bei dem Patienten vorliegt. Ebenso geht aber auch aus den Abbildungen 81 und 82 hervor, dass eine parallele Spaltung im Plasma des Patienten vorliegt, welche das gleiche Bandenmuster einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF aufzeigt, wie es in den Versuchen aus 4.1.5.1 beschrieben wurde.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

Das Western Blot Verfahren ist eine gute und vielfach erprobte Methode, um das Vorhandensein von bestimmten Proteinen, deren ungefähre Molekülgröße, sowie eventuell vorhandene posttranslationale Modifikationen nachzuweisen [122]. Ursprünglich wurde das Verfahren des Western Blots eingeführt, um lediglich eine rein qualitative Aussage machen zu können, nämlich ob Proteine vorhanden sind oder nicht [123]. In den letzten Jahren kam es zu einer stetigen Verbesserung des Verfahrens, so dass aufgrund der Entwicklung empfindlicher fluoreszierender Markierungen, eine verbesserte Empfindlichkeit entstand und noch größere Bereiche, sowie eine lineare Detektion gezeigt werden konnte. Es entstanden quantifizierbare fluoreszenzbasierte Western Blots, mit denen Biologen eine vergleichende Expressionsanalyse mit größerer Empfindlichkeit und Genauigkeit durchführen können [124].

5.1.1 Anreicherung des VWF an CNBr-aktivierte Sepharose Beads aus humanem Plasma

Die Möglichkeit Antikörper auf Sepharose 4B Beads zu koppeln ist eine in der Forschung ebenfalls bekannte und angewandte Methode [125-127]. Eine direkte Adsorption aus dem humanen Plasma wird dagegen selten beschrieben. Meist kommt vor der Kopplung ein vorgezogener Aufreinigungsschritt [128]. Unser erstes Ziel lag in einer Anreicherung des VWFs aus humanem Plasma an CNBr-aktivierte Sepharose 4B. Der spezifische Nachweis des VWF kommt in den nachfolgend beschriebenen Schritten durch die Detektion im Western Blot mit dem primären Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper.

Bei Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen den humanen VWF zur Anreicherung erhielt man im Gel nach Silberfärbung (Abbildung 11) eine Vielzahl von Banden, die nicht nur vom VWF stammen können. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Plasmaproteine, die an den gebundenen VWF oder unspezifisch an die mit Antikörpern beladene CNBr-aktivierte Sepharose 4B binden. Trotz der im Protokoll

beschriebenen Verdünnungen und Reinigungsschritte erkennt man, dass es neben einer Adsorption des VWF an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B zu weiteren unspezifischen Bindungen kommt. Ferner lässt sich aber auch schon im Silbergel erkennen, dass es bei steigender Menge von RaVWFab auf der CNBr-aktivierten Sepharose 4B zu einer verstärkten VWF-Adsorption mit den Banden bei 250 kDA, 140 kDa und bei 176 kDa kam, die dem VWF und seinen physiologischen, ADAMTS13 induzierten Fragmenten im reduzierten Zustand entsprachen. Dass es sich bei den unspezifischen Proteinen nicht um den VWF handelt, wurde durch die nachfolgenden Western Blots, bei denen der primäre Kaninchen-anti-human-VWF-Antikörper beziehungsweise monoklonale anti-VWF-Antikörper benutzt wurden, weiter bestätigt. Beim Einsatz von drei verschiedenen monoklonalen anti-VWF Antikörpern konnten nur Banden beobachtet werden, die typisch sind für die ADAMTS13- und/oder Plasmin-induzierten VWF Spaltprodukte. Um auszuschließen, dass es zu keiner unspezifischen Proteinbindung mit den eingesetzten monoklonalen anti-VWF-Antikörpern kommt, wurde zusätzlich zuerst eine Negativkontrolle mit BSA (Abbildung 12 und 13) und später dann eine Negativkontrolle mit IgG mitgeführt. Es zeigten sich in den Negativkontrollen keine weiteren Banden, so dass wir davon ausgehen können, dass der zuvor adsorbierte VWF spezifisch von dem polyklonalen, primären Kaninchen-anti-human-WVF-Antikörper und von den monoklonalen anti-VWF-Antikörpern gebunden wird. Balkani et al. konnten gereinigten Kaninchen anti-BSA IgG an CNBr-aktivierte sepharose 4B Beads binden, um damit Albumin aus Rinderserum zu reinigen [129]. Letztlich erzielten sie dabei eine Ausschöpfung von etwa 50% mit einer Reinheit von 98%. In unseren ersten Experimenten zeigte sich hier ein ähnliches Ergebnis. Bei einem hohen Angebot von 180 µg RaVWFab auf 30 µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B kam es zu einer Extraktion von 0,875 µg reinem VWF, was bei der Menge von 1,28 µg adsorbiertem VWF einer prozentualen Ausschöpfung des Plasmas von 68,4% an angebotenem VWF entspricht (Abbildung 14 und Tabelle 12). Die nachfolgenden Versuche zeigten, dass es bei einer Verdünnung von 1:4 und einer Volumenmenge von 1000 µl zu einer weiteren Zunahme der Adorption kam. Die zunächst berechnete prozentuale Ausschöpfung des Plasmas an VWF ließ zunächst eine bessere Ausschöpfung bei 1:6 mit 500µl vermuten (76% Ausschöpfung vs. 53% Ausschöpfung). Absolut gesehen konnten wir aber durch Messung der Überstände zeigen, dass es zu einer höheren absoluten Ausschöpfung des VWF bei einer Adsorption von 1000 µl mit einer 1:4 Verdünnung kommt (1,26µg vs. 0,68µg bei an

180µg RaVWFab an 30µl Sepharose-Beads). Unsere Untersuchungen wurden durch eine densitometrische Auswertung der Pixeldichte bestätigt. Bei 180 µg RaVWFab auf 30µl CNBr-aktivierte Sepharose 4B kommt es zur stärksten Adsorption des VWF und seiner beiden Spaltprodukte an unsere CNBr-aktivierte Sepharose 4B (siehe Abbildung 15 und 16 sowie Tabelle 13). Die Abbildung 17-23 zeigen die Adsorptionen von drei unterschiedlichen Probanden, bei denen eine unterschiedliche Menge an RaVWFab auf den CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Beads eingesetzt wurde. Mit zunehmender Kopplung von RaVWFab nahm auch die VWF Adsorption an den CNBr-aktivierten Sepharose-Beads zu. Dies konnte sowohl im Western Blot quantitativ über einen Anstieg der Pixeldichte als auch durch Berechnung gezeigt werden. Die Werte in Tabelle 14 zeigten uns, dass unsere Methode durchaus in der Lage ist, Konzentrationen von 1 - 1,5 µg VWF zu adsorbieren. Es sei hier angemerkt, dass bei einer solchen Berechnung immer mit einem gewissen zufälligen Fehler, der beim Pipettieren oder Verdünnen vorkommen kann, gerechnet werden muss. Wir gehen daher am ehesten davon aus, dass man mit unserer Methode bei 180 µg RaVWFab auf 30 µl Sepharose Beads bis zu 1 µg VWF adsorbieren kann.

5.1.2 Densitometrische Auswertung der VWF Signale auf Western Blots

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mittels einer FUSION USB 2.0 „analysis camera“ mit 4,2 MP CCD und einem 16-bit „grey level“. Ein 16-bit „Grey Level“ bedeutet, dass die Kamera und die Software im Stande sind über 65000 Graustufen voneinander zu unterscheiden. Zum Vergleich kann das menschliche Auge lediglich 64 Graustufen voneinander unterscheiden [130]. Wir wählten daher, um eine gute Vergleichbarkeit innerhalb der Western Blots zu bekommen, immer ein Bitlevel bei der Auswertung größer als 60000 Graustufen aus, aber kleiner als die maximale Auflösung der Kamera zuließ (maximal 65,535 Graustufen). Dies diente zum einen der Vergleichbarkeit, aber auch der Sicherheit, dass die Western Blots beim Entwickeln nicht übersättigt wurden und wir die Pixeldichte in einem Bereich gemessen haben, der als nicht übersättigt gilt. Butler et al. zeigten, dass es gerade bei der quantitativen Auswertung von Western Blots zu verschiedenen technischen Schwierigkeiten kommen kann, wenn es darum geht, eine ursprünglich qualitative Technik in eine quantitative Technik zu transferieren [131]. In seiner Arbeit beschreibt er verschiedene Fehlerquellen, die bei der Quantifizierung von Western Blots möglich

sind. Mögliche Fehlerquellen sind unter anderem eine eingeschränkte Zugänglichkeit von Farbstoffen, Antikörpern und oder Epitope, die Konzentration der verwendeten primären oder sekundären Antikörper, Einschränkungen in der lokalen Konzentration des HRP-Substrats, Oxidation von HRP, was an die Sekundärantikörper gebunden ist beziehungsweise wie in unseren Experimenten ein primärer HRP-gekoppelter Antikörper. In Anbetracht der Umstände, dass es sich bei unseren Experimenten um eine experimentelle Methodenentwicklung handelt, wenngleich auch unsere Einordnung Ergebnisse durch Messungen der Konzentration nach Adsorption bestätigt wurden, muss bei der densitometrischen Auswertung von Western Blots immer noch mit Abweichungen gerechnet werden, die sich aktuell schlecht quantifizieren lassen. Allerdings ist für eine valide Quantifizierung von Western Blot-Proben eine verlässliche und reproduzierbare Methode unverzichtbar. Hierbei ist es wichtig, dass die Messwerte aus der Western Blot-Analyse keine technischen Artefakte darstellen, oder dass Fehler beim Messen der Signalstärke die Messwerte beeinflussen [132, 133].

Gerk et al. verwendeten für die Quantifizierung des Expressionsniveaus eines ATP-bindenden Kassettentransporters einen infrarotmarkierten Sekundärantikörper [134]. Es zeigte sich hier eine lineare Regression der Intensitätsdaten, wobei die Bestimmungsgrenzen für die von ihnen beschriebene zeitunempfindliche Technik zwischen 0,001 µg und 0,5 µg Gesamtmembranprotein lagen (R^2-Werte: 0,986 ± 0,012).

Wie bei Taylor et al. beschrieben, mussten wir eine Überladung und eine damit einhergehende Überexpression der Signale bei der Messung unserer Proben ausschließen, um valide Ergebnisse zu erhalten. Um vorab zu prüfen, dass sich beim Einfüllen der Proben in die Probekammer keine zu starke Abweichung innerhalb des Western Blots darstellt, führten wir Messungen durch, die zeigen sollten, dass bei gleicher Proteinmenge in einer Proben-Spur es zu keiner großen Abweichung innerhalb des Gels kommt. Abbildung 32 und die dazugehörige Abbildung 33 zeigen viermal aufgetragene identischen Proben mit je 1 µg VWF (Willfact®) mit einer geringen Standardabweichung (Tabelle 16, Standardabweichung 1,41%). Es gibt zahlreiche Möglichkeiten Proteine im Western Blot anzufärben. Die weitläufig herkömmlichen Methoden zur Proteinanfärbung sind aber aufgrund einer niedrigen Sensitivität und einer niedrigen dynamischen Reichweite, innerhalb der quantifiziert werden kann, nur bedingt für den Einsatz der Quantifizierung geeignet [133, 135, 136].

Für eine gute und verlässliche Quantifizierung von Western Blot Signalen wird eine Satin-Free Technologie empfohlen [133, 137, 138]. Wir wählten zur Detektion einen spezifischen polyklonalen Antikörper, der gegen den humanen VWF gerichtet ist. Durch die Verwendung von diesem Detektionsantikörper konnte der VWF, welcher zuvor mittels der CNBr-aktivierten Sepharose 4B aus dem Plasma adsorbiert wurde, ebenso wie die mitgeführten Standards aus rhVWF detektiert werden.

5.1.3 Adsorption von proteolytisch gespaltenem VWF an CNBr-aktivierte Sepharose Beads

Um herauszufinden, ob auch bei einer erhöhten Spaltung die CNBr-aktivierte Sepharose 4B immer noch in der Lage ist kleinere VWF-Polymere gut zu adsorbieren, führten wir eine proteolytische Spaltung des VWF auf einer Dialysemembran durch. Eine erhöhte Spaltung des VWF kann unter anderem bei Mutationen in der VWF-A2-Domäne bei einem speziellen VWS Typ 2 auftreten oder wenn erhöhte Scherkräfte im Blutstrom entstehen [52, 71, 79]. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 24-31 dargestellt. Der Versuchsaufbau wurde nach Furlan et al. durchgeführt [6, 8]. Hierbei zeigte sich, dass es mit einer plasmatischen ADAMTS13 zu einer Zunahme der VWF-Spaltprodukte, sowie zu einer Abnahme der VWF-Monomere in den reduzierten Proben kam. Bei einer verstärkten VWF-Spaltung wurden diese Spaltprodukte von den CNBr-aktivierten Sepharose 4B-Beads stärker adsorbiert, als wenn man sie direkt über die SDS-PAGE auftrennte. Sowohl optisch im Western Blot also auch densitometrisch bestätigt, zeigte sich hier ein stärkeres Anfärben des 176 kDa-Spaltprodukts gegenüber dem 140 kDa Spaltprodukt, was im Widerspruch zu den Ergebnissen in Abbildung 14 steht. Die hier durchgeführte Spaltung erfolgte mittels plasmatischer ADAMTS13 an einem aus Plasma gereinigtem VWF (Willfact®). Die Ergebisse zeigten uns aber auch, dass bei einer erhöhten Spaltung des VWF unsere CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Beads in der Lage waren die kleineren Multimere zu adsorbieren. Warum es zu den Unterschieden in der Bandenintensität kam, können wir zum derzeitigen Zeitpunkt nicht erklären.

5.1.4 Notwendigkeit von VWF-Proteinstandards

Eine etablierte Methode zur Quantifizierung von Proteinen innerhalb eines Western Blots ist das Vergleichen der Banden mit so genannten Housekeeping-Proteinen. Die Housekeeping-Proteine werden für gewöhnlich durch einen weiteren Antikörper oder durch Anfärben detektiert und spiegeln nicht den totalen Proteingehalt der Probe wider [139-142]. Aldridge et al. führten Untersuchungen mit Gesamtproteinfärbungen durch und zeigten, dass dies eine akzeptable Alternative zu Einzelproteinkontrollen sei [143]. Da bei der von uns entwickelten Methode nicht die Möglichkeit bestand, auf ein Housekeeping-Protein zurückzugreifen, benötigten wir eine andere Form, um die quantifizierten Daten in Relation mit der adsorbierten Proteinmenge zu bringen. Wir benötigten daher für die Quantifizierung VWF-Proteinstandards. Die quantitative Bestimmung von relativen Proteinkonzentrationen kann durch eine Markierung von spezifischen Antikörpern dargestellt werden. Ein häufiger Fehler ist eine Überladung der Kontrollen [124, 143]. Es wird ein linearer Bereich beschrieben, in dem Probenbeladung und die gemessenen Bandenintensität einen linearen Verlauf ergeben [144-147]. Der lineare Bereich ist der Bereich der Probenbeladung bei dem die Intensität proportional zur Probenbeladung zunimmt. Mit dem Korrelationskoeffizient R^2 kann man bestimmen, wie nahe man an einer linearen Regression liegt. Es wird empfohlen, dass alle zu quantifizierenden Ergebnisse innerhalb des linearen Bereiches liegen sollen [122]. Unsere Verdünnungsreihen mit Willfact® und mit dem rhVWF als Standardpräparat zeigten gute und reproduzierbare Ergebnisse (Abbildung 35-37 Willfact®: R^2 0,9102; 0,8314; 0,9102 und Abbildung 40-42 rhWVF: R^2 0.9476; 0,9255; 0,921). Aufgrund der guten Korrelation und der reproduzierbaren Ergebnisse gehen wir davon aus, dass wir hier im linearen Bereich liegen und die Plasmaproben mit geschätzt 1 µg adsorbierten VWF gut gemessen werden können.

Die ersten Untersuchungen zeigten, dass sich die Farbintensität der gespalteten Banden unterschiedlich stark widerspiegelt (siehe Abbildung 14). Dabei zeigten sich Unterschiede in der Bandenanfärbung zwischen der 140 kDa und der 176 kDa Bande. Die Abbildung 14 zeigt, dass sich die 140 kDa deutlicher darstellt als die 176 kDa Bande. Bei allen drei Probanden zeigte sich eine leicht stärkere Intensität der 140 kDa Bande gegenüber der 176 kDa Bande. Mögliche Gründe für ein solches Auftreten sind

vielfältig. Es könnte zu einer bevorzugten Substratbindung der Spaltprodukte an unseren Antikörper kommen, zum anderen können sich trotz geringerer Molekülgröße mehr primäre Antikörper an das 140 kDa-Spaltprodukt binden. Ein gleiches Ergebnis zeigte bereits Furlan et al., als sie eine Reinigung des VWF durchführten [6]. Gleichzeitig zeigten uns die Ergebnisse, dass es neben der Herstellung für ein VWF-Monomer-Standard ebenfalls wichtig ist, einen Standard für den gespaltenen VWF herzustellen.

Die Herstellung von Standards für die beiden VWF-Spaltprodukte gestaltete sich als aufwändig. In Abbildung 38 wird gezeigt, dass unter den in Tabelle 17 und 18 beschriebenen Bedingungen keine vollständige Spaltung des aufgereinigten VWF Willfact® erzielt werden konnte. Auch bei den durchgeführten Modifikationen in Tabelle 18 und 19 zeigte sich keine vollständige Spaltung des VWF (Abbildung 43). Um den Reinheitsgrad zu erhöhen, verwendeten wir von diesem Zeitpunkt ab neben rhVWF auch eine rekombinante ADAMTS13 und versuchten eine Proteolyse über die Zeit (Abbildung 44). Es zeigte sich dabei, dass es zwar zu einer Abnahme des VWF-Monomers bei 250 kDa kam, sowie zu einer Zunahme der Spaltprodukte des rhVWF bei 140 kDa und bei 176 kDa. Allerdings war auch mit einer rhADAMTS13 keine vollständige proteolytische Spaltung des rhVWF zu diesem Zeitpunkt möglich.

Die Auswirkungen von Shear-Stress auf den VWF sind schon oft beschrieben worden [68, 115, 148-150]. Um hier einen neuen Ansatz zu schaffen und eine vollständige Spaltung des rhVWF durch rhADAMTS13 zu erzielen, wurde der Versuchsaufbau verändert. Die durchgeführten Veränderungen sind in den Tabellen 22-24 beschrieben. Unter den beschriebenen Veränderungen kam es nun zu einer nahezu vollständigen Spaltung des VWF. Die anfangs gewählten 300 rpm reichten noch nicht aus, um genügend Scherkräfte zu erzeugen, dass sich der VWF vollständig spalten ließ. Erst eine Erhöhung auf bis zu 2500 rpm zeigte den gewünschten Erfolg der nahezu vollständigen Spaltung (Abbildung 45). Um bei den VWF-Spaltprodukten zu gewährleisten, dass sie sich bei den verwendeten Konzentrationen in einem linearen Bereich befinden, wurden auch hier Verdünnungsreihen erstellt, die wie auch für das VWF-Monomer eine gute Korrelation zwischen aufgetragener Proteinmenge und densitometrisch gemessenem Ergebnis zeigten. (Abbildung 46-48; Abbildung 46 R^2 176 kDa=0,8212 und R^2 140 kDa=0,8716; Abbildung 47 R^2 176 kDa=0,8195 und R^2 140 kDa=0,8758; R^2 176 kDa=0,8358 und R^2 140 kDa=0,9278). Aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens mussten wir beide Spaltprodukte getrennt

voneinander betrachten. Wir führten bei unseren Experimenten auch eine VWF-Spaltung über die Zeit hinweg durch. Parallel dazu haben wir vier Standardpräparate des VWF-Monomers mit auf den Western Blot aufgetragen. In den Abbildungen 49-52 ist zu sehen, dass es über zwei Stunden zu einer deutlichen Abnahme des VWF Monomers kommt. Verglichen mit unserer Standardkurve und wie auf dem Western Blot in Abbildung 49 zu sehen ist, liegt hier nach zwei Stunden noch keine vollständige Spaltung des VWF-Monomers vor. Die Kinetik folgt dabei einem nicht-linearen Verlauf. Analog dazu geht aus Abbildung 50 hervor, dass es zu einer Zunahme der VWF-Spaltprodukte über die Zeit kommt. Lippok et al. beschrieben, dass die Spaltung des VWF durch die ADAMTS13 einer Michaelis-Menten Kinetik folgt [150]. Auf Grund dieser Kinetik ist es experimentell wahrscheinlich nicht möglich, eine komplett vollständige Spaltung des VWF zu erzielen. Allerdings konnten wir in unseren Experimenten eine nahezu vollständige *in vitro* Spaltung des VWF etablieren. Es muss bei der Verwendung der VWF-Standards daher immer davon ausgegangen werden, dass die vollständige *in vitro* Spaltung auf Grund der Kinetik des VWF nicht möglich ist. Folglich geben uns die über die Standardpräparate ermittelten Konzentrationsangaben nur näherungsweise exakte Ergebnisse. Dies muss bei der Interpretation der gemessenen Daten immer berücksichtigt werden. In 4.1.3.9. zeigen wir eine Möglichkeit der Verwendung der Standardpräparate für ein intaktes Monomer sowie einen gemeinsamen Standard für die 140 kDa- und 176kDa-VWF-Fragmente. Wir wählten dafür drei Standardpräparate des VWF-Monomers, sowie drei der VWF-Spaltprodukte und zeigten die Messung anhand von drei Spendern, bei denen zuvor eine Sepharose-Bead-Adsorption durchgeführt wurde. In Tabelle 28 sieht man die Berechnungen der durchgeführten Adsorptionen. Die Ergebnisse decken sich mit dem optischen Vergleich des Western Blots in Abbildung 57. Die Eichkurve für das VWF-Monomer und für die VWF-Spaltprodukte sind in den Abbildungen 58 und 59 dargestellt. Beide Eichkurven weisen auf eine nahe zu lineare Regression mit R^2 von 0,9978 bei dem VWF-Spaltprodukt und R^2 von 0,8928 bei dem VWF-Monomer hin.

5.2 Charakterisierung verschiedener Fragmente des VWFs mit monoklonalen Antikörpern

Die Detektion des VWF durch verschiedene Antikörper wurde bereits mehrfach in der Literatur veröffentlicht [106, 121, 151, 152]. Der VWF entfaltet sich mit zunehmenden Scherkräften, so dass er durch die ADAMTS13 in der A2-Domäne gespalten werden kann. Der häufigste qualitative VWF Defekt, der Typ 2A, wird durch den Verlust von hochmolekularen Multimeren des VWF verursacht. Die zugrunde liegenden Mutationen befinden sich in Genbereichen der A2-Domäne des VWF [153]. Daher war eine Darstellung der Spaltungstelle des VWF für uns von großem Interesse. Wir setzten einen monoklonalen anti-VWF-A2-Antikörper (anti-VWF-A2-AK) von R&D Systems® ein, der gezielt gegen das Neoepitop des N-terminalen 140 kDa-Fragments gerichtet ist, welches durch die proteolytische Spaltung des VWF entsteht [120]. Der eingesetzte Antikörper detektiert ein entstehendes Epitop, das bei Spaltung der humanen VWFA2-Domäne mit ADAMTS13 erzeugt wird. Es erkennt nicht die intakte VWF-A2-Domäne. Neben dem anti-VWF-A2-AK wurden noch zwei weitere monoklonale Antikörper - M7 und M31 - eingesetzt, die uns freundlicherweise von Professor Zaverio Ruggeri zur Verfügung gestellt wurden. Die Antikörper wurden von unter anderem von Berkowitz et al. beschrieben [106]. Da es sich sowohl beim anti-VWF-A2-AK als auch bei den M7 und M31 um monoklonale Antikörper handelt, wurden alle Antikörper mit einem sekundären HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK detektiert. Berkowitz et al. beschreiben, dass sich konstitutiv kleine Mengen an Spaltprodukten des VWF im Plasma gesunder Probanden befinden. Diese Spaltprodukte wurden als 189, 176 und 140 kDa-Fragmente identifiziert, die von dem 225 kDa-Monomer abgespalten wurden. Berkowitz beschrieb weiter, dass das 140 kDa-Fragment von der aminoterminalen Region stammt, während das 176 kDa-Fragment von der carboxyterminalen Region des VWF-Monomers abgespalten wurde. Im Gegensatz dazu spaltete Plasmin ein 176-kD-Fragment vom aminoterminalen Ende und ein 145 kDa-Fragment vom carboxyterminalen Ende des VWF-Monomers ab. Es wurden verschiedene Antikörper entwickelt, die unterschiedliche Regionen des VWF erkennen können. Abbildung 84 zeigt Schnittstellen des VWFs und in welchem Bereich die von Berkowitz et al. beschriebenen Antikörper binden. Hier wurden „natürliche/native Fragmente“ des VWF beschrieben, die heute als die von ADAMTS13

generierten Fragmente bekannt sind, als auch die Fragmente, die durch eine Plasminspaltung generiert wurden [6, 7]. Besonders hevorzuheben aus der Abbildung sind die von uns verwendeten Antikörper M7 und M31.

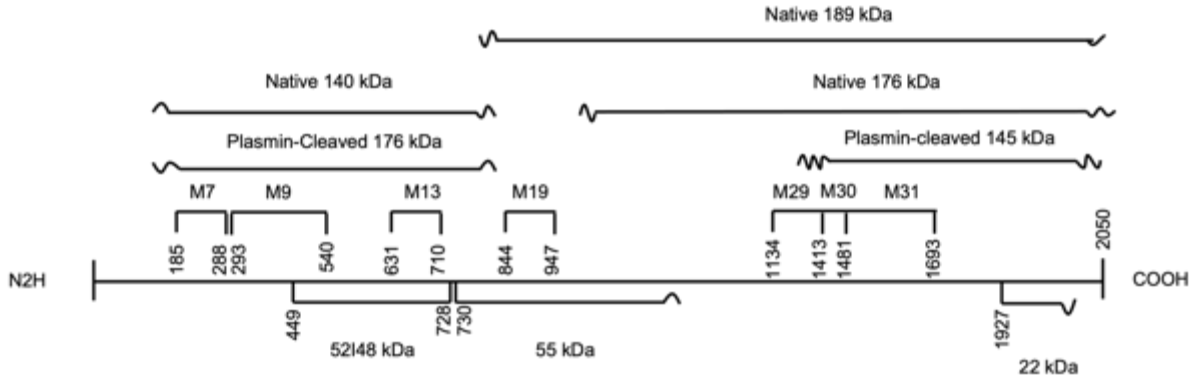

Abbildung 84: Schematische Darstelung der monoklonale Antikörper, Epitopkarte nach Berkowitz et al.l [92], die zwischen Plasmin- und nativ gespaltenem VWF differenziert.

Weiter konnten Berkowitz et al. zeigen, dass die 176 kDa und 140 kDa VWF-Fragmente beim VWS Typ 2A VWF proportional erhöht sind, was darauf hindeutet, dass die in vivo-Proteolyse von VWF in diesem Subtyp verstärkt ist. In dieser Studie konnte sowohl Plasmin als auch Calpain *in vitro* den Verlust großer VWF-Multimere bedingen. Allerdings gingen die Autoren zu diesem Zeitpunkt bereits davon aus, dass Plasmin weder ursächlich für die erhöhte Spaltung von VWF bei einem VWS Typ 2A sei noch für die basale Spaltung des VWF. Zu dem Zeitpunkt der Veröffentlichung war die ADAMTS13 als Enzym, das den VWF physiologisch spaltet, noch nicht entdeckt. Erst später wurde die ADAMTS13 als Protease identifiziert, die den VWF in die beiden nativen Spaltrodukte von 140 kDa und 176 kDA spaltet [6, 7]. Neben der ADAMTS13 und Plasmin sind noch weitere Enzyme bekannt, die den VWF spalten können. Unter anderen sind Calpain, humane Elastase aus Leukozyten und Elastase aus dem Schweinepankreas beschriebene Enzyme, die in der Lage sind, den VWF zu spalten. [152, 154-156]. Raife et al. beschrieben weitere Enzyme, die den VWF spalten können wie Proteinase 3, Cathepsin G und Metalloprotease 9 [156]. Es ist davon auszugehen, dass diese Enzyme für die VWF-Spaltung *in vivo* eher keine Rolle spielen, da Proteinase 3 und Cathepsin G durch α-1-Antitrypsin und Metalloprotease 9 durch Gewebeinhibitoren im Blut gehemmt werden [157-159]. Die VWF-Spaltung durch diese Enzyme wurde in unseren Experimenten nicht untersucht. In Abbildung 60 ist in Spur 1 eine Bande bei etwa 140 kDa zu erkennen. Der rhVWF in dieser Probe wurde mit rhADAMTS13 gespalten. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bande um

das N-terminale 140 kDa Spaltprodukt des VWF handelt. In dieser Spur wurde sowohl ein primärer Antikörper eingesetzt als auch ein sekundärer Antikörper. Der eingesetzte primäre Antikörper war anti-VWF-A2-AK. In Spur 2 wurde der VWF mit Plasmin gespalten. Hier lässt sich keine Bande mit dem anti-VWF-A2-AK detektieren. Es zeigt sich, dass es bei einer Plasminspaltung des VWF zu keiner Darstellung im Western Blot kommt, wenn man den anti-VWF-A2-AK benutzt. Dieser Antikörper erkennt nur die durch ADAMTS13 hervorgerufene Spaltung am N-terminalen Fragment, welches Tyrosin 1605 enthält. In den Spuren 3 und 4 wurde jeweils nur der sekundäre HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-AK eingesetzt. Es konnte weder ADAMTS13 gespaltener rhVWF detektiert werden (Spur 3) noch Plasmin gespaltener rhVWF (Spur 4). Die Spuren 3 und 4 dienten als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen des sekundären HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-AK auszuschließen.

Wir führten weitere Untersuchungen mit den oben genannten Antikörpern durch, um herauszufinden, ob sich auch nach einer Sepharose-Bead Adsorption der VWF mit den Antikörpern M7 und M31 darstellen lässt. In Abbildung 61 sieht man einen Western Blot, bei dem verschiedenen Antikörper zum Einsatz kamen. Spur 1 diente wieder zum Ausschluss von unspezifischen Reaktionen des Antikörpers. In Spur 2 ist keine Bande zu erkennen. Der in Spur 2 eingesetzte Primärantikörper anti-VWF-A2-AK wurde hier schon zum zweiten Mal benutzt, weshalb wir daher am ehesten von einem negativen Ergebnis ausgehen, das auf einen Antikörperverbrauch oder eine fehlerhafte Lagerung zurückzuführen ist. In Spur 3 und 4 wurden die von Berkowitz et al. beschriebenen Antikörper M7 und M31 nach einer VWF-Bead-Adsorption verwendet. Wir sehen in Spur 3, wie es für M7 in beschrieben wurde, eine deutliche Bande bei ca. 250 kDa und eine Bande bei 140 kDa [106]. In Spur 4 sehen wir ebenfalls, wie es zuvor für den M31 Antikörper beschrieben war, eine deutliche Bande bei 250 kDa und bei 176 kDa. Neben diesen deutlichen Banden zeigten sich noch weitere Banden, unter anderem eine diskrete Bande bei etwa 180 kDa, die keinem Fragment mit Gewissheit zugeordnet werden konnte. Spur 5 zeigte ebenfalls die beschriebenen Fragmente bei 250 kDa, 176 kDa und 140 kDa. Unsere Adsorptionsergebnisse auf dem Blot in der Abbildung 61 zeigt, dass mit den Antikörpern M7, M31 und dem anti-VWF-A2-AK zum einen eine relativ gute Differenzierung zwischen einer Plasmin und einer ADAMTS13 induzierten Spaltung des VWF möglich ist und desweiteren dies sogar mit einer Sepharose-Bead Adsorption gelingen kann. Die Spaltung des VWF durch Plasmin wurde neben

Berkowitz et al. auch von diversen weiteren Autoren beschrieben [41, 121, 160]. In einem vorgeschalteten Experiment konnten wir eine *in vitro* Spaltung des VWF durch Plasmin zeigen, bei dem sich neben dem 250 kDa Monomer ein 225 kDa Fragment zeigte (Abbildung 62). Um zu verifizieren, dass sich die VWF-Spaltprodukte induziert durch Plasmin mit denen induziert durch ADAMTS13 im Western Blot decken, wurden die unterschiedlich gespaltenen VWF-Proben gemischt (Abbildung 63). Rein optisch kann man im Western Blot nicht unterscheiden, ob es sich bei dem 140 kDa Spaltprodukt in Spur 2 um ein ADAMTS13-gespaltenes oder um Plasmin-gespaltenens VWF-Fragment handelt. Da bei der Spaltung mit Plasmin weitere Spaltprodukte auftraten, wurde ein 10% Polyacrylamid-Gel angefertigt, um kleinere Fragmente nicht während der SDS-PAGE zu verlieren. Des Weiteren verringerten wir die Plasminkonzentration von 0,5 µg/ml Plasmin auf 0,1 µg/ml Plasmin pro Ansatz, aufgrund der Annahme, dass es durch die Reduktion der Konzentration von Plasmin zu einer besseren Abgrenzung einzelner Spaltprodukte über die Zeit kommt. Plasmin ist eine unspezifische Protease, die eine Vielzahl von Proteinen zwischen Arg-Xaa- und Lys-Xaa-Bindungen spaltet. Plasmin ist jedoch ein viel weniger effizientes Enzym als zum Beispiel Trypsin und spaltet nur einen Teil zwischen Arg-Xaa- und Lys-Xaa-Bindungen in Proteinen [161]. Eine Spaltstelle des VWF wurde schon von Brophy et al. bei K1491-R1492 in der A1–A2 Region beschrieben [41]. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass es noch zu weiteren Spaltungen kommen kann, was sich in unseren Experimenten gezeigt hat. In den Spuren 1 und 2 traten die zu erwartenden Bandenmuster (Abbildung 64) auf, ebenso in den Spuren 4, 5 und 6. In Spur 3 zeigte der M7 Antikörper zwei bis dahin nicht bekannte VWF-Spaltprodukte bei 35 und bei 30 kDa. Von welchem Teil des VWF diese kleinen Spaltprodukte stammen, können wir zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen nötig. Brophy et al. zeigten, dass sich der globuläre VWF unter statischen Bedingungen nicht von Plasmin spalten lässt, aber unter Scherkräften, kann es zu einer Spaltung des VWF durch Plasmin kommen. Desweiteren zeigten sie, dass Plasmin nicht an der proteolytischen Stelle Tyr1605-Met1606 von ADAMTS13 in der A2-Domäne, sondern in Gegenwart von Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Ristocetin die K1491-R1492-Peptidbindung innerhalb der VWF A1-A2-Linkerregion spaltet. Tersteeg et al. zeigten, dass eine deutliche Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin ein gemeinsames Merkmal bei Patienten während akuter TTP-Episoden darstellt [17]. Diese Beobachtung ist in dem Kontext wichtig, da zuvor gezeigt wurde,

dass Plasmin *in vitro* mit hohen Enyzmkonzentrationen ADAMTS13 proteolysieren und damit auch inaktivieren kann [162, 163]. Daher war es von großem Interesse, dass wir in unserem Modell eine möglichst große Zuverlässigkeit schaffen, um eine gute Differenzierung zwischen einem von ADAMTS13 gespaltenen VWF und einem von Plasmin gespaltenem VWF darzustellen. Wir führten weitere Experimente mit einer reduzierten Plasminkonzentration durch, um deutlichere Spaltungen zu erlangen und eine bessere Färbung mit den Antikörpern M7 und M31 zu erhalten. In Abbildung 65 erkennt man, dass es durch eine Plasminspaltung über die Zeit zu einer Abnahme des VWF-Monomers bei 250 kDa kam, so wie zu einer Zunahme der Spaltprodukte bei 140 kDa und 176 kDa. Parallel wurden in Abbildung 66 und 67 zwei weiter Western Blots durchgeführt. Hierfür wurde als Sekundärantikörper der M7-Antikörper mit Zunahme des 176 kDa-Spaltproduktes (Abbildung 66) beziehungsweise der M31-Antikörper (Abbildung 67) mit Zunahme des 140 kDa-Spaltproduktes benutzt. Die mitgeführte Kontrolle in Spur 6 von Abbildung 66 und 67 zeigte jeweils einen ADAMTS13 gespaltenen VWF. Die Spaltprodukte von ADAMTS13 gespaltenenem VWF zeigen bei Verwendung der Sekundärantikörper M7 und M31 ein inverses Bandenmuster gegenüber einer plasminbedingten Spaltung des VWF. Bei Verwendung des M7-Antikörpers bei einer ADAMTS13 induzierten Spaltung des VWF zeigt sich ein Spaltprodukt bei 140 kDa und bei Verwendung des M31-Antikörpers stellt sich bei 176 kDa ein Spaltprodukt dar. Eine reine Verwendung des polyklonalen anti-VWF-AK kann im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörper M7 und M31 zwischen ADAMTS13- und Plasmin-induzierten VWF-Spaltungsfragmenten nicht unterscheiden. Abbildung 68 zeigte uns, dass sich bei einer Plasminspaltung mit einer geringeren Konzentration die Spaltungstelle nicht mit dem Anti-VWF-A2-AK darstellen lässt. Unsere Untersuchungen stützen die Aussagen von Berkowitz et al., dass die Spaltstelle für Plasmin nicht mit der von ADAMTS13 identisch ist. Diese Aussage unterstützt die Untersuchungen von Brophy et al., dass die Spaltstelle von Plasmin zwischen K1491-R1492 liegt [41]. In den Versuchen von Brophy et al. konnte der VWF mit Plasmin nur unter „shear stress“ gut gespalten werden. Ferner konnten wir zeigen, dass bei es zu einer vermehrten Spaltung von VWF über die Zeit kommt, was sich anhand der steigenden Anzahl von Plasmin-induzierten Spaltprodukten darstellt (Abbildungen 69-71).

5.3 Zu den Untersuchungen des VWF und seiner *in vivo* Spaltprodukte bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen

5.3.1 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei Patienten mit hereditärem oder erworbenem VWS

Bei den Patienten P1_VWS-P6_VWS mit erworbenem oder hereditärem VWS wurden entsprechende Plasmen auf VWF-Spaltprodukte untersucht (Abbildungen 72, 73). Das VWS Typ 2A, wie es bei den Patienten P1_VWS, P4_VWS und P5_VWS vorlag, ist durch eine verminderte Thrombozyten-abhängige VWF-Funktion gekennzeichnet, die durch das Fehlen von großen und mittelgroßen Multimeren im Plasma charkterisiert ist [164, 165]. Mutationen in Exon 28 können zu zwei unterschiedlichen pathogenen Mechanismen führen. Zum einen werden so genannte Typ-I-Mutationen beschrieben. Diese Mutationen führen zu Störungen im intrazellulären Transport, was durch eine verminderte VWF-Sekretion aufgrund von falsch gefaltetem Protein gekennzeichnet ist. Zum anderen sind so genannte Typ-II Mutationen beschrieben. Hierbei kommt es zu einer normalen Synthese des VWF. Das Fehlen der großen und mittleren Multimere im Plasma dieser Patienten wird auf eine erhöhte Proteolyse durch ADAMTS13 zwischen Y1605-M1606 der reifen VWF-Untereinheit zurückgeführt [166, 167]. Bei Patient P1_VWS ist eine heterozygote Mutation an der Stelle p.Gly1609Arg beschrieben. Diese Mutationsstelle liegt sehr nahe an der ADAMTS13-Spaltungsstelle zwischen Y1605-M1606. In Abbildung 72 erkennt man eine deutliche Zunahme der Spaltprodukte bei 176 kDa und 140 kDa. Patient P4_VWS mit gleich drei nachgewiesenen Mutationen, von denen eine Mutation mit einem VWF 2A assoziiert ist (p.Arg1374Cys), zeigt keine Zunahme der Spaltprodukte in Abbildung 72 und in Abbildung 73. Ebenso zeigt sich bei Patient P5_VWS (p.Arg1374Cys) keine Zunahme der VWF-Spaltprodukte. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass je näher die Mutation im Bereich der ADAMTS13-Spaltstelle liegt, es zu einer verstärkten deutlichen Spaltung kommen kann. Klinisch sind uns leider zu wenige Informationen über die einzelnen Patienten bekannt, sodass wir hier keine weiteren Schlussfolgerungen über die Stärke der klinischen Ausprägungen sagen können. Aponte-Santamaría et al. beschrieben, dass es bei der Untersuchung bei

Patienten mit einer Gly1629Glu-Mutation des VWF zu einer drastisch erhöhten proteolytischen Spaltung kommt, selbst wenn keine Scherkräfte oder Denaturierungsmittel auf den VWF einwirken. Es wird postuliert, dass die erhöhte proteolytische Aktivität gegen den VWF bei Gly1629Glu durch eine erhöhte Verfügbarkeit der ADAMTS13-Spaltstelle verursacht wird, was wiederum durch thermodynamische Destabilisierung der A2-Domänenfaltung erklärt wird [168]. Hassenpflug et al. zeigte, dass es bei Patientenplasmen mit der wie bei Patient P1_VWS beschrieben Mutation p.Gly1609Arg zu einer gesteigerten Proteolyse des VWF kam und die proteolytische Spaltung von mutiertem VWF *in vitro* eng mit dem *in vivo*-Phänotyp bei Patienten korrelierte. Sie sahen in ihren Ergebnissen, dass eine erhöhte VWF-Empfindlichkeit für ADAMTS13 eine Eigenschaft des klassischen VWS-Typs 2A ist, was zum einen durch das Vorhandensein von proteolytischen Fragmenten und zum anderen durch den Verlust von HMWM erklärt wird, wie es bei der Multimer-Analyse bei diesen Patienten beobachtet wurde [153]. Unsere Ergebnisse unterstützen die bislang erfolgten Ergebnisse, dass es bei einer Mutation im Bereich G1609R zu einer erhöhten Protolyse des VWF kommt. Ob es, wie bei Aponte-Santamaría et al., analog bei p.Gly1629Glu-Mutationen, über eine thermodynamische Destabilisierung in der A2-Domänenfaltung erfolgt, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesagt werden.

Pérez-Rodríguez et al. zeigte in der Zentrumsstudie „Molekulares und klinisches Profil der von Willebrand-Krankheit in Spanien (PCM-EVW-ES)“ Untersuchungen des VWS unter Einbeziehung der phänotypischen Bewertung anhand der Multimer-Analyse und der genetischen Analyse durch „Next Generation Sequencing“ des VWF-Gens. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle der Multimer-Analyse bei der Diagnose dieser Patienten und ihre möglichen Diskrepanzen zu bewerten. Es konnte gezeigt werden, dass das bei der p.Arg1374His-Mutation bei 26 Patienten vorlag. Bei zehn der Patienten konnten keine HMWM nachgewiesen werden, während die anderen 16 ein normales Multimermuster zeigten. Die derzeitige Erklärung für diese Unterschiede besagt, dass die Mutation p.Arg1374His-Mutation mit einer gewissen phänotypischen Heterogenität verbunden ist [169]. In einer ähnlichen Weise spiegeln sich die Ergebnisse von Pérez-Rodríguez et al. auch in unseren Untersuchungen wider. Bei den beiden Patienten P4_VWS und P5_VWS konnten keine Veränderungen des Bandenmusters, noch die Intensität der Spaltung im Vergleich zu den NHP in den Spuren 1, 5 und 9 gesehen werden. Das VWF:AG bei P1_VWS wurde uns mit 111%

angegeben und lag um ein Vielfaches höher als bei Patient P4_VWS (13%) und P5_VWS (32%). Wie schon im Ergebnisteil erwähnt, zeigt sich bei Patient P5_VWS eine verstärkte Bande bei etwa 180 kDa und eine Bande bei etwa 80 kDa, die weder in den Kontrollen, noch bei den anderen Patienten beobachtet werden konnte. Aufgrund der beschriebenen makroskopischen Probenveränderung ist nicht sicher davon auszugehen, dass es hier zu einem Problem bei der Probe selbst kam. Es bedarf auch hier weiterer Untersuchungen, um eine definitive Aussage bezüglich neuer VWF-Fragmente machen zu können.

Bei den Patienten P3_VWS und P6_VWS in Abbildung 72 liegt jeweils ein erworbenes VWS vor. Während bei Patient P3_VWS eine myeloproliferative Neoplasie und ein VWF:Ag von 117% vorliegt, ist bei Patient P6_VWS eine monoklonale Gammopathie IgG Typ Kappa mit einem VWF:AG von 15% beschrieben. In beiden Fällen zeigt sich sowohl keine deutliche Abweichung im Bandenmuster als auch in der Intensität der einzelnen VWF-Spaltprodukte der NHP in den Spuren 1, 5 und 9.

Michiels et al. beschriebstellte 44 Fällen über Patienten mit einem aVWS, welches durch eine monoklonale IgG Gammopathie (IgG Kappa 25, IgG Lambda 14, IgG 4 und freies Lambda 1) ausgelöst wurden. Die Patienten hatten unter anderem eine verlängerte Blutungszeit und aPTT, eine normale Prothrombinzeit und Thrombozytenzahl, eine erniedrigte RIPA und niedrige bis sehr niedrige FVIIIC-Werte (Mittelwert 15%), VWF: Ag (Mittelwert 5 10,7%) und VWF: RCo (Mittelwert 5 6,2%). Die Multimer-Analyse zeigte ein typisches Typ-II-Muster ohne große VWF-Multimere in 13 ausgewerteten Fällen. Auch hier zeigt sich in der Multimer-Analyse eine gewisse Variabilität, wenn auch der genaue Pathomechanismus noch unklar zu sein scheint [170]. Es zeigt sich hier bei unseren Untersuchungen, dass es nicht zu einer verstärkten Spaltung des VWF in den beiden Fällen kam. Es bedarf an dieser Stelle weiterer Untersuchungen, um dem Pathomechanmismus zu klären und inwiefern es trotz scheinbarem Verlust der großen Multimere zu einer normalen proteolytischen Spaltung des VWF kommt. Zusammenfassend bestätigten unsere Ergebnisse bereits publizierte Daten, dass es bei einer Mutation p.Gly1609Arg zu einer gesteigerten Proteolyse des VWF kommt sowie dass es im Bereich von p.Arg1374His nicht zwangsläufig zu einer Veränderung im Bandenmuster kommen muss und durchaus Patienten beschrieben worden sind, die ein normales VWF-Multimermuster aufwiesen, auch wenn es sich bei dem Patienten bei uns um eine p.Arg1374Cys Mutation handelt. Gerade aber die große heterogene Gruppe des aVWS bedarf noch weiterer

Untersuchungen, um die genauen Mechanismen der proteolytischen VWF-Spaltung zu klären.

5.3.2 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei Patienten mit iTTP im akuten Schub und in Remission

Die erworbene TTP ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Autoantikörper, normalerweise vom IgG-Typ, die gegen die ADAMTS-13 gerichtet sind [171]. Ein Drittel der TTP-Überlebenden erleidet im Laufe der Jahre Rückfälle, insbesondere kurz nach der Erstvorstellung [13, 172]. Viele Studien haben einen Zusammenhang zwischen Infektionen und dem Auftreten von iTTP beobachtet. So können Infektionserreger bei Patienten mit einem schweren ADAMTS13-Mangel durch endotheliale Aktivierung ein auslösender Faktor für einen TTP-Schub sein. Es konnten keine spezifischen Trigger identifiziert werden, im Gegensatz zu HUS, das typischerweise mit spezifischen Stämmen des Bakteriums *Escherichia coli* assoziiert war [173, 174]. Als Reaktion auf Infektionen oder entzündliche Reize setzen neutrophile Granulozyten Chromatinfasern frei, die als „Neutrophile extrazelluläre Fallen“ bekannt sind (NETs). Diese NETs binden Mikroben und tragen zur Abwehr des Wirts bei. Sie bestehen hauptsächlich aus DNA von neutrophilen Granulozyten [175]. Darüber hinaus können NETs Thrombozyten aktivieren und Erythrozyten immobilisieren und somit Thrombosen verursachen [176-178]. NETs werden aus neutrophilen Granulozyten nach einem Zelltodprogramm freigesetzt, das von der Auflösung von Granula- und Kernmembranen bis zur Dekondensation und Zytolyse von Chromatin reicht [179]. Somit werden DNA und Histone an Stellen, an denen eine Entzündungsreaktion mit neutrophilen Granulozyten stattfindet, freigesetzt, um das Eindringen von Mikroben zu kontrollieren. Allerdings kann genau dieser Mechanismus bei Patienten mit zum Beispiel einem schwerem ADAMTS13-Mangel eine akute Erkrankung auslösen [180]. Als Reaktion auf diese endotheliale Aktivierung setzen Endothelzellen hochmolekulare VWF-Multimere frei, die zu Thromben in der Mikrovaskulatur der meisten Organe führen. Dieses als „Zwei-Treffer-Modell“ bezeichnete Szenario wurde in Tiermodellen belegt und veranschaulicht die Wechselwirkung zwischen einem genetischen Hintergrund und weiteren Einflüssen von außen, wie Infektionen und Entzündungen [173]. Aus aktivierten und degranulierten humanen neutrophilen Granulozyten freigesetzte Peptide können auch

die ADAMTS13-Aktivität verändern [181]. Pillai et al. zeigten, dass „human neutrophil peptides“ (HNPs) *in vitro* starke Inhibitoren der ADAMTS13-abhängigen VWF-Proteolyse sind. Es wird eine physikalische Blockade zwischen ADAMTS13 und dem VWF an der zentralen A2-Domäne vermutet, was zu einer Beeinträchtigung der Proteolyse des Substrats führt. Es wurden erhöhte Spiegel von HNPs zum Zeitpunkt des akuten Schubes im Plasma der meisten TTP-Patienten gefunden. Zum Zeitpunkt der Ergebnisse bei den TTP-Patienten war eine ausreichende Quantifizierung der Banden mit unserer Bead-Absorption noch nicht möglich und retrospektiv nicht anwendbar. Ebenso war die Verwendung der Antikörper anti-VWF-A2, M7 und M31 bedauerlicherweise ebenfalls noch nicht möglich. Daher müssen die Ergebnisse, die wir von diesen Patienten haben, rein quantitativ beurteilt werden. Als Referenz dazu dienen die Normalplasmen in den Spuren 1,5 und 9 von den Abbildungen 72 und 73. Bei Patient P1_TTP handelt es sich um einen Patienten mit einer erworbenen TTP im akuten Schub. Die ADAMTS13-Aktivität wurde mit <1% angegeben. Bei Patient P3_TTP handelt es sich um eine erworbene TTP während einer Schwangerschaft. In einer Schwangerschaft kommt es zu einem Zustand der Hyperkoagulabilität mit erhöhten Plasmakonzentrationen des VWF, der aus Endothelzellen freigesetzt wird. Die Schwangerschaft wird als das auslösende Ereignis für etwa 5 bis 25% der TTP-Fälle beschrieben [15]. Die ADAMTS13-Aktivität lag zum Zeitpunkt der Probenentnahme <1%. Bei den Patienten P1_TTP und P3_TTP zeigte sich in den Abbildungen 72 und 73 kein Unterschied im Bandenmuster oder in der Intensität der Banden im Western Blot im Vergleich zu den Normalplasmaproben. Gleichzeitig zeigten beide Patienten im akuten Schub das Vorhandensein von Spaltprodukten des VWF in äquivalenter Menge, wie bei einem NHP aus den Spuren 1, 5 und 9. Tersteeg et al. untersuchten die Hypothese, dass ein zweites Enzym die ADAMTS13 in Abwesenheit ersetzen kann. Sie zeigten in in-vitro-Experimenten, dass Thrombozyten-VWF-Komplexe durch Urokinase-abhängige Plasminogenaktivierung an Endothelzellen effizient abgebaut werden können. Es wird dabei von einer lokalen Plasminogenaktivierung ausgegangen, wie sie während der TTP-bedingten Mikroangiopathie beobachtet wird [17]. Letztlich konnten wir leider zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen noch nicht zwischen einer ADAMTS13 induzierten Spaltung und einer Spaltung, die dem Antikörpermuster einer Plasminspaltung gleicht, unterscheiden. Wir konnten zu diesem Zeitpunkt lediglich zeigen, dass auch in einem akuten Schub der TTP VWF-Spaltprodukte im Plasma anwesend sind. Der Patient

P2_TTP mit einer erworbenen TTP in Remission und einer Aktivität der ADAMTS13 von 10,5% zeigt uns im Vergleich zu den NHP allenfalls eine angedeutete verminderte Proteolyse des VWF anhand des Bandenmusters. Ob es tatsächlich in Remission zu einer verminderten Proteolyse des VWF kommt, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3.3 VWF-Bead-Adsorptionsuntersuchungen bei einer Patientin mit hereditärer TTP in Remission

Das Plasma einer Patientin mit hereditärer TTP wurde untersucht und die Ergebnisse in den Abbildungen 74 und 75 vorgestellt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war die ADAMTS13-Aktivität vermindert mit 10,8%. Definitionsgemäß ist die ADAMTS13-Aktivität bei heriditärer TTP <10% [11]. Lotta et al. führten im Rahmen einer Untersuchung, ob eine Korrelation zwischen der Plasmarestaktivität von ADAMTS13 und dem Schweregrad des Phänotyps bei Patienten mit angeborener thrombotischer thrombozytopenischer Purpura vorliege, Laboruntersuchungen durch. Bei 26 Patienten zeigte sich eine messbare Restaktivität von ADAMTS13 und 3 Patienten hatten eine Aktivität < 0,5% (Median 3,08%). Die Aktivität lag bei allen Patienten unter 10 %. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Probengewinnung während der Remission erfolgte und mindestens nach 20 Tagen seit der letzten FFP oder anderen Blutproduktgaben zurückliegt [182]. Leider sind bei der Patientin keine Daten bekannt, welche eine ADAMTS13-Aktivität von 10,8% erklären würden, wie zum Beispiel eine erst kürzlich erfolgte therapeutische Behandlung mit Plasma. Klinisch befand sich die Patientin zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Remission. Es zeigten sich in Spur 1 ein Bandenmuster mit einer Bande bei 250 kDa, bei 176 kDa und bei 140 kDa. Diese Bandenmuster deuten erst mal auf eine normale ADAMTS13-induzierte Spaltung hin, was bei einer stärkeren Belichtung in Abbildung 75 bestätigt wird. Die Spuren 3 und 4 mit den M7 bzw M31 eingesetzten Antikörpern zeigen uns, dass trotz verminderter ADAMTS13-Aktivität alles auf eine ADAMTS13-induzierte Spaltung des VWF hindeutet. Tersteeg et al. untersuchten, ob bei TTP-Patienten eine Plasminogenaktivierung auftrat [17]. Sie konnten zeigen, dass in der Phase bei einer akuten TTP die Plasmin-Antiplasmin (PAP)-Komplexspiegel erhöht waren, während sie im Vergleich bei Patienten in Remission und bei gesunden Spendern normal waren. Gleichzeitig zeigten sie, dass gerade diese Komplexe bei TTP-Patienten mit

Thrombozytenzahlen unter 50×10^3 Thrombozyten/µl vorwiegend erhöht waren. Thrombozytopenien sind ein Kardinalzeichen eines akuten Schubes bei einer TTP. Tersteeg et al. deuteten dies insofern, dass die Plasminogenaktivierung hauptsächlich bei Patienten, während einer schweren thrombotischen Mikroangiopathie auftreten würde. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Gruppe von Patienten mit akuter TTP erhöhte PAP-Komplexe auftraten. Bei TTP-Patienten in Remission wurden jedoch keine erhöhten PAP-Komplexspiegel detektiert. Es wird angenommen, dass mikrovaskuläre Obstruktionen eine lokale Hypoxie verursachen, die zu einer Plasminogenaktivierung auf Endothelzellen führt. In der ersten Phase kommt es zur kontinuierlichen Blutplättchenagglutination und das Mikrogefäßsystem beginnt zu „verstopfen“. In späteren Stadien kommt es zur Größenzunahme der Thromben, bis klinische Symptome auftreten. In der Frühphase könnte Plasmin noch thrombosierte Gefäße eröffnen und somit das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen [17]. Es wären weitere Untersuchungen notwendig, um zu zeigen, dass es wirklich zu einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF bei einem akuten Schub kommt. Gleichzeitig unterstützen unsere Ergebnisse die Annahme von Tersteeg et al., dass es bei Patienten in Remission nicht zu einer erhöhten Spaltung des VWF durch Plasmin kommt, was sich in Form von erhöhten PAP-Komplexen zeigen würde.

5.3.4 Untersuchung des VWF und seiner Spaltprodukte bei Patienten mit Plasmazelldyskrasie-assoziiertem erworbenem VWS

Dicke et al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung „Distinct mechanisms account for acquired von Willebrand syndrome in plasma cell dyscrasias“ verschiedene Mechanismen, welche zur Entstehung eines erworbenen VWS führen können. Freundlicherweise wurden uns drei der beschriebenen Plasmen zur Untersuchung der VWF-Spaltprodukte mittels Sepharose-Bead-Adsorption zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden Vorgeschichte und die Diskussion der Ergebnisse der Patienten 1, 5 und 6 aus Dicke et al. erläutert [78]. Plasmazelldyskrasien sind eine sehr heterogene Gruppe von hämatologischen Störungen, die durch eine pathologische Proliferation von monoklonalen Plasmazellen entstehen und durch die Bildung eines Paraproteins gekennzeichnet sind [170, 183]. Die Patientendaten und Befunde der laborchemischen hämostaseologischen Untersuchungen wurden von Dicke et al. veröffentlicht. Ein Auszug dieser Ergebnisse ist in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Auszug aus Dicke et al., Ergebnisse und Daten über die einzelnen beschriebenen Patienten [78]

Typen der Plasmazelldyskresie und VWS-assoziierte Laboruntersuchungen				
	Referenzbereich	Patient 1	Patient 5	Patient 6
Alter		62	63	63
Geschlecht		männlich	weiblich	männlich
Plasmazelldyskresie		MGUS	Multiples Myelom und AL-Amyloidose	Multiples Myelom
Paraprotein		IgG-κ	λ-Leichtketten	IgG-λ
Serumkonzentration des Paraproteins (g/l)		2,2	-	51,4
Thrombozytenanzahl (10^9/l)	150-400	299	187	275
aPPT (s)	25-38	50	46	37
FVIII:C (%)	60-160	11	61	173
Plättchenfunktionsanalyse (PFA 100®)				
Kollagen/Epinephrin (s)	84-160	>300	>300	>300
Kollagen/ADP (s)	68-121	>300	>300	>300
VWF:AG	20-200	12	126	384
VWF:RCo	70-180	<10	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
VWF-GpIb-Bindungs aktivität (VWF:Ac)	61-171	nicht durchgeführt	20	309
VWF-Plasmamultimere		schwerer Typ 1	Typ 2	Normal
Anti-VWF	negativ	negativ	negativ	negativ
Vermuteter Mechanismus		immunologische Reinigung	Plasmin- und ADAMTS13-induzierte Zersetzung	Inhibition der GpIb-Bindung

5.3.4.1 Ergebnisse von Patient 1

Bei dem Patienten 1 wurde eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) vom Typ IgG-Kappa nachgewiesen. Klinisch präsentierte sich die Erkrankung mit leichten Blutergüssen und Weichteilhämatomen. Laborchemisch zeigte sich ein verringertes VWF:AG sowie ein verringertes VWF:RCo Verhältnis. In der Multimer-Analyse zeigte sich das Bild eines schweren VWS Typ-1. Es waren alle Multimere vorhanden, aber in ihrer Gesamtkonzentration im Vergleich zu einem NHP deutlich verringert. Nach der Verabreichung von intravenösen Immunglobulinen kam es zum starken Anstieg des VWF:AG und VWF:RCo. Dicke et al. vermuteten, dass dieses aVWS auf eine beschleunigte immunologische Clearance zurückzuführen ist. Pathologisch wird in der Literatur ein Mechanismus beschrieben, bei dem der VWF durch Zellen des retikuloendothelialen Systems abgebaut wird [184, 185]. Die VWF-Bandenmuster von Patientin 1 in Spur 3 und die unserer Kontrolle in Spur 4, gezeigt in den Abbildungen 76-79, unterscheiden sich nicht voneinander. Wir können weder eine gesteigerte ADAMTS13-Spaltung des VWF erkennen noch einen Hinweis, der auf eine Plasmin-induzierte Spaltung des VWF hindeuten könnte. Im Western Blot der Abbildung 76 zeigt sich makroskopisch die lediglich die geringe Konzentration des

gesamten VWF. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei diesem Patienten keine gesteigerte Spaltung des VWF durch die beiden Enzyme ADAMTS13 und Plasmin stattgefunden hat.

5.3.4.2 Ergebnisse von Patient 5

Patient 5 zeigte klinisch leichte Blutergüsse sowie eine verlängerte Blutung nach einer Zahnextraktion. Laborchemisch fiel eine Verlängerung der aPTT auf, bei normaler Thrombinzeit und Prothrombinzeit. Das VWF:AG lag bei 126% und die VWF:Ac bei 20%. Die Multimer-Analyse zeigte einen Verlust von den größeren und den mittelgroßen VWF-Multimeren sowie ein abnormales Triplett. VWF-Autoantikörper konnten bei diesem Patienten nicht nachgewiesen werden. Die deutlich reduzierten Plasminogen- und α2-Antiplasmin Plasmaspiegel suggerierten eine erhöhte fibrinolytische Aktivität, die durch erhöhte zirkulierende PAP-Komplexe bestätigt wurde. Die normalen D-Dimer und Fibrinogenspiegel sprachen gegen eine disseminierte intravaskuläre Koagulation. Bei den anderen untersuchten Patienten von Dicke et al. wurden keine erhöhten PAP-Komplex-Spiegel gemessen. Letztlich wurde bei Patient 5 die Diagnose einer Leichtketten-Amyloidose gestellt und es wurde eine Chemotherapie (CTX) gestartet, gefolgt von einer autologen peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSCT). Neun Monate nach erfolgter PBSCT zeigten sich verminderte Werte von Lambda-Leichtketten, sowie normale Plasminogen- und α2-Antiplasmin-Spiegel im Plasma. (Tabelle 40) Allerdings waren die PAP-Komplexe weiterhin erhöht. Die zuvor in der Multimer-Analyse beschriebene abnormen Triplettstruktur der VWF-Multimere schien nun weniger ausgeprägt zu sein. Klinisch gab es keinen Hinweis auf eine Herzinsuffizienz oder Aortenklappenstenose, welche das erworbene VWS alternativ erklären konnte. Bereits 15 Monate nach der PBSCT wurden wieder vermehrt monoklonale Lambda-Leichtketten nachgewiesen sowie ein Rückgang der α2-Antiplasmin-Spiegel auf 47%, kombiniert mit einem dramatischen Anstieg der PAP-Komplexe auf 19.446 ng/ml. (Tabelle 40) Ebenfalls trat wieder vermehrt die atypische Triplettstruktur der VWF-Multimere auf. Dicke et a. vermuteten, dass es bei dem Patient 5 zu einer massiven Plasminerzeugung kommt, die dafür sorgt, dass der VWF gespalten wird. Eine erhöhte fibrinolytische Aktivität wurde bereits einem erworbenen VWS bei anderen Fallberichten beschrieben [186, 187]. Ferner vermuteten Dicke et al., dass die gesteigerte fibrinolytische Aktivität durch eine

Erhöhung der uPA-vermittelten Plasminaktivierung zustande kam, wie sie in manchen Krebszellen vorkommt [188, 189]. Dicke et al. nahmen an, dass es sowohl zu einer ADAMTS13- als auch zu einer Plasmin-induzierten VWF-Proteolyse bei Patient 5 kam. Letztere habe dann zu einem erworbenen VWS geführt.

Tabelle 40: Plasmazelldyskresie-, Fibrinolyse- und VWS-assoziierte Parameter über die Zeit von Patient 5 nach Dicke et al. [78]

Plasmazelldyskresie-, Fibrinolyse- und VWS-assoziierte Parameter über die Zeit von Patient 5							
	Normal	Initial	Nach TXA	Nach der Induktion CTX	5 Monate nach PBSCT	9 Monate nach PBSCT	15 Monate nach PBSCT
Freie λ-Leichtketten (mg/l)	5,7-26,3	217,8	nicht durchgeführt (n.d.)	81,8	32,1	30,8	84,0
Differenz zu freie Leichte Ketten im Serum (mg/l)		216,8	n.d.	77,3	15,1	17,4	69,0
aPTT (s)	25-38	46	42	42	35	33	47
Fibrinogen (g/l)	1,8-4,0	1,8	2,2	4,6	3,9	5,3	3,5
D-Dimere (mg/l)	<0,5	1,1	0,3	0,5	0,7	0,6	2,5
Plasminogen (%)	75-140	27	n.d.	76	88	86	83
α_2-Antiplasmin (%)	80-120	24	38	25	42	89	47
PAP (ng/ml)	0-514	n.d.	n.d.	n.d.	7310	4809	19446
VWF:AG (%)	60-200	126	167	189	553	329	317
VWF:Ac (%)	61-179	20	19	52	52	70	44
Multimere		Typ 2 mit atypischem Triplet	n.d.	Typ 2 mit atypischem Triplet	Typ 2 mit atypischem Triplet	Typ 2 mit atypischem Triplet sowie Verlust der großen Multimere	n.d.

Unsere Untersuchungen des plasmatischen VWF mit der Sepharose-Bead-Adsorption zeigen in den Abbildungen 76-79 bei Patient 5 in Spur 2 ein anderes Bandenmuster als bei den Patienten 1, 6 und bei der mitgeführten Kontrolle. In Abbildung 76 sieht man, dass es zwei Spaltprodukte bei etwa 140 kDa und bei 176 kDa gibt. Dieses Muster unterscheidet sich auf den ersten Blick nicht von dem des NHP. In Abbildung 77 erkennt man, dass es bei Patient 5 zu einer ADAMTS13 induzierten Spaltung des VWF kam. In Abbildung 78 und 79 erkennt man jedoch auch andere VWF-Fragmente bei etwa 176 kDa und 140 kDa. Die eingesetzten Antikörper zeigen ein Muster auf, wie sie bei einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF vorkommen. Auf Abbildung 78 erkennt man auf dem Western Blot, bei dem der M7-Antikörper als Primärantikörper diente, ein Fragment bei 176 kDa. Analog dazu ist auf Abbildung 79, bei der der M31-Antikörper als Primärantikörper eingesetzt wurde, ein Fragment bei ca. 140 kDa zu erkennen. Unsere Ergebnisse bestätigen hier die von Dicke et al. vermutete

Hypothese, dass es zu einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF kam, bei gleichzeitig bestehender ADAMTS13-Spaltung des VWF. Nach mehreren Jahren wurde vom gleichen Patienten eine erneute VWF-Sepharose-Bead-Adsorption durchgeführt und mit drei NHP verglichen. Das VWF:Ag des Patienten 5 lag bei 180%, die VWF:Ac bei 46% und die PAP-Komplexe waren weiterhin erhöht. Die Abbildungen 80 bis 83 zeigen, dass Patient 5 auch nach mehreren Jahren bei erhöhten PAP-Komplexen ein VWF-Bandenmuster im Plasma nach Adsorption an Sepahrose-Beads aufzeigt, das weiterhin mit einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF übereinstimmt.

5.3.4.3 Ergebnisse von Patient 6

Bei Patient 6 wurde ein Multiples Myelom mit einem IgG vom Typ Lambda nachgewiesen. Klinisch auffällig wurde das Multiple Myelom im Rahmen einer instabilen Wirkelkörperfraktur, welche operiert werden musste. Aufgrund von thorakalen Blutungen mussten mehrere chirurgische Revisionen durchgeführt werden. Die Ursachen der thorakalen Blutungen konnten mittels Thrombozyten-funktionsanalysen gezeigt werden. Im PFA-100® zeigte sich ein schwerer Defekt der primären Hämostase. Die Multimeranalyse war normal, ebenso die Konzentrationen für das VWF:AG. (Tabelle 39) Die Aggregometrie ergab zunächst Hinweise auf ein Bernard-Soulier-Syndrom. Es konnten allerdings keine Defizienz des Thrombozyten-Glykoproteinkomplexes Ib/IX/V und keine Antikörper gegen GPIb/IX oder andere Thrombozytenantigene nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen lieferten den Hinweis, dass bei dem Patienten ein „Faktor im Plasma“ vorhanden war, der zu einer verlängerten Ristocetin-induzierten-Thrombozyten-Agglutination (RIPA) führt. Letztlich führte eine Chemotherapie mit anschließender PBSCT zu einer Normalisierung des Serum-IgGs, der freien Lambda Ketten, der PFA-100®-Verschlusszeiten und der RIPA. Die Hypothese von Dicke et al. war, dass die zirkulierenden Paraproteine die Ristocetin-induzierte Bindung der VWF A1-Domäne mit dem GPIb-Rezeptor der Thrombozyten hemmt. Unterstützt wurde diese Hypothese durch einen ähnlichen Fallbericht [190]. Unsere Untersuchungen gaben zum derzeitigen Zeitpunkt bei der Sepharose-Bead-Adsorption keinen Hinweis auf eine verstärkte ADAMTS13- oder eine vorhanden Plasmin-induzierte Spaltung des VWF.

6 Ausblick

Die hier aufgeführte Methodenetablierung stellt einen gelungenen Ansatz zur wissenschaftlich-experimentellen Untersuchung des VWF dar. Quantifizierungen von Western Blot Signalen sind immer aufwendig und mit vielen Fehlermöglichkeiten behaftet. Diese in dieser Arbeit neu entwickelte semiquantitative Methode mittels Western Blot Verfahren erlaubt eine zuverlässige Analyse von VWF-Spaltprodukten, die sich aber sicherlich noch weiter optimieren lässt. Die gelungene vollständige Spaltung des rhVWF durch rhADAMTS13 gibt neue Möglichkeiten, den VWF und seine Fragmente im Western Blot zu quantifizieren. Grundsätzlich können alle Patientenplasmen untersucht werden, in denen eine gesteigerte Proteolyse des VWF zu erwarten ist. Für die sichere Identifizierung von einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF ist die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wünschenswert, der analog zu unserem eingesetzten anti-VWF-A2-AK an das Neoepitop bei der Plasminspaltung bindet. Dies würde eine Identifizierung zum einen wesentlich erleichtern und zum anderen würde man sich sicher sein können, dass eine Plasminspaltung stattgefunden hat. Unsere Methode zeigte gute Ergebnisse bei der Untersuchung von Patientenplasmen. Insbesondere konnte unsere Methode bereits beschriebene Phänomene wie eine erhöhte Spaltung des VWF bei bestimmten Mutationen, wie dem VWS Typ 2A bestätigen. Um weitere Aussagen über Patienten mit einer TTP zu machen, bedarf es auch hier weiterer Untersuchungen. Insbesondere von großem Interesse kann die Untersuchung von einer Plasmin-induzierten Spaltung bei Patienten in einem akuten Schub mit verminderter Thrombozytenzahl sein.

Neben den hier beschriebenen Ursachen für ein aVWS sind ebenso medizinische Interventionen bekannt, bei denen es durch Ausübung vermehrter Scherkräfte zu einem aVWS kommt. Als Beispiel für solche Interventionen, die zu einem aVWS führen, sind neben dem Einsatz eines „Left Ventricular Assist Device“ auch der Einsatz einer extrakorporalen Membranoxygenierung bekannt [70, 191, 192]. Gerade in der COVID19-Pandemie wurde vermehrt das letztere Verfahren im schweren Stadium einer Infektion mit SARS-CoV-2 eingesetzt. Aktuelle Studien berichten immer wieder, dass es beim Einsatz einer extrakorporalen Membranoxygenierung zu schweren Blutungsstörungen kommen kann [193-195].

Ebenfalls von großem Interesse ist die Untersuchung bei Patienten, die eine erhöhte fibrinolytische Aktivität aufweisen, wie sie in dem Patienten 5 in den Abbildungen 76-83 beschrieben wurde. Es bleibt daher von großem Interesse, bei Zuständen, bei denen es zu einer verstärkten fibrinolytischen Aktivität kommt, den VWF im Plasma genau zu analysieren, wie zum Beispiel mit der von uns entwickelten Anreicherungsmethode des VWFs mittels Sepharose-Bead-Adsorption. Diese Erkenntnisse könnten zukünftig wichtige Hinweise geben, welche Auswirkungen eine fibrinolytische Therapie hat. Gerade im klinischen Kontext bei einer starken Aktivierung des fibrinolytischen Systems, wie sie zum Beispiel bei Thrombolysen im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls, einer fulminanten Lungenembolie oder eines Herzinfarktes entstehen, könnte ein aVWS Blutungsgefahr erhöhen [196-198].

7 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsschrift konnte die erfolgreiche Methodenetablierung zur Analyse der *in vivo* generierten von Willebrand Faktor (VWF) Spaltprodukte in einem reduzierten Gel gezeigt werden. CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde mit anti-humanen VWF-AK beladen und im Anschluss konnte aus einem 1:4 verdünnten humanen Plasma etwa 1 µg VWF inklusive seiner Spaltprodukte absorbiert werden. In einem zweiten Schritt konnten der absorbierte VWF und seine Spaltprodukte mittels SDS-PAGE und Western Blot dargestellt werden. Bei einer verstärkten Spaltung des VWF, welche in einem Dialysesystem generiert wurde, zeigte die CNBr-aktivierte Sepharose 4B eine gute Absorptionsqualität des VWF-Monomers sowie seiner beiden Spaltprodukte bei 140 kDa und 176 kDa.

Die hergestellten Verdünnungsreihen mit rhVWF zeigten einen linearen Verlauf. Ferner war es möglich eine nahezu vollständige *in vitro* Spaltung des rhVWF mit rhADAMTS13 zu erreichen. Die *in vitro* generierten VWF-Spaltprodukte zeigten in den Verdünnungsreihen ebenfalls einen linearen Verlauf. Es konnten somit Standardproteinlösung in ungespaltener und in gespaltener Form hergestellt werden, anhand derer eine quantitative Aussage mittels Desitometrie über die Menge des aus Patientenplasma absorbierten VWF gemacht werden konnte.

Durch den Einsatz verschiedener Antikörper (M7, M31 und anti-VWF-A2-AK) konnte eine Differenzierung zwischen einer ADAMTS13- und einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF im Western Blot gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem anti-VWF-A2-AK das durch eine ADAMTS13-Spaltung entstandene Neoepitop dargestellt werden konnte. Die ADAMTS13-Spaltung fand *in vitro* statt und die Darstellung erfolgte in einem reduzierten Gel. Ferner konnte gezeigt werden, dass es bei einer *in vitro* Plasmin-induzierten Spaltung des VWF zu keiner Darstellung des VWF mit dem anti-VWF-A2-Ak im Western Blot kam. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich beim Verwenden der M7-Antikörper bei einer ADAMTS13-induzierten *in vitro* Spaltung das Spaltprodukt bei 140 kDa darstellen lässt, während bei einer *in vitro* Plasmin-induzierten Spaltung des VWF sich mit dem M7-Antikörper ein Spaltprodukt bei 176 kDa darstellte. Analog dazu zeigte sich beim Verwenden des M31-Antikörpers bei einer *in vitro* ADAMTS13-induzierten Spaltung ein Spaltprodukt bei 176 kDa, während sich bei einer *in vitro* Plasmin-induzierten Spaltung des VWF

ein Spaltprodukt bei 140 kDa darstellte. Durch Verwendung der drei Antikörper M7, M31 und anti-VWF-A2-AK konnte somit zwischen einer ADAMTS13- und einer Plasmin-induzierten *in vitro* Spaltung des VWF unterschieden werden. Ferner zeigte sich, dass bei der *in vitro* generierten, Plasmin-induzierten Spaltung des VWF in einem 10% Polyacrylamidgel neue Spaltprodukte bei etwa 30 und 35 kDA auftraten.

Die Untersuchungen der Patietenplasmen mit VWS zeigten, dass es bei der Mutation im VWF-Gen p.Gly1609Arg zu einer gesteigerten *in vivo* Proteolyse des VWF kam, was anhand einer verstärkten Darstellung der Spaltprodukte bei 140 kDa und 176 kDa im Western Blot gezeigt werden konnte. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass es bei einer Mutation p.Arg1374Cys nicht zu einer verstärkten Spaltung des VWF im Western Blot kam. Die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen bestätigen bereits veröffentlichte Untersuchungen an VWS Typ2 [166, 167].

In den Plasmen von Patienten, welche an einer iTTP litten, als auch im Plasma von einem Patienten, der an einem sich bei Abnahme des Plasmas in Revision befundenem Upshaw-Schulman Syndrom litt, konnte keine *in vivo* generierte, Plasmin-induzierte Spaltung des VWF nachgewiesen werden. Dass es bei einer hereditären TTP in Remission nicht zu einer Plasmin-induzierten Spaltung des VWF kommt, deckt sich mit den Ergebnissen von Tersteeg et al. [17].

Die Untersuchungen der Patientenplasmen bei den Patienten 1, 5 und 6, die bereits bei Dicke et al. mit einem aVWS beschrieben wurden, zeigten Übereinstimmungen bei den vermuteten Pathomechanismen [78]. Insbesondere bei dem von Dicke et al beschriebenen Patient 5 konnte mit den Antikörper M7, M31 und anti-VWF-A2-AK eine *in vivo* generierte Spaltung des VWF mit Plasmin und ADAMTS13 nachgewiesen werden. Es wurde damit zum einen der von Dicke et al. vermutete Befund bestätigt, dass es bei diesem aVWS zu einer gesteigerten Plasmin-induzierten Spaltung des VWF kommt. Zum anderen konnte mit den Ergebnissen gezeigt werden, dass die eingesetzten Antikörper M7, M31 und anti-VWF-A2-AK in der Lage sind, auch eine *in vivo* generierte Spaltung des VWF nachzuweisen.

Literaturverzeichnis

1. Darwin, C.R. *To A. R. Wallace*. Darwin Correspondence Project, “Letter no. 2192“ [Letter] 1857 [cited 2016; Available from: www.darwinproject.ac.uk.
2. Moschcowitz, E., *An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease.* Am J Med, 1952. **13**(5): p. 567-9.
3. Singer, K., F.P. Bornstein, and S.A. Wile, *Thrombotic thrombocytopenic purpura; hemorrhagic diathesis with generalized platelet thromboses.* Blood, 1947. **2**(6): p. 542-54.
4. AMOROSI, E.L. and J.E. ULTMANN, *THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA: REPORT OF 16 CASES AND REVIEW OF THE LITERATURE.* Medicine, 1966. **45**(2): p. 139-160.
5. Moake, J.L., et al., *Unusually large plasma factor VIII:von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.* N Engl J Med, 1982. **307**(23): p. 1432-5.
6. Furlan, M., R. Robles, and B. Lammle, *Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis.* Blood, 1996. **87**(10): p. 4223-34.
7. Tsai, H.M., *Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion.* Blood, 1996. **87**(10): p. 4235-44.
8. Furlan, M., et al., *Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 1997. **89**(9): p. 3097-103.
9. Zheng, X., et al., *Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura.* J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41059-63.
10. Levy, G.G., et al., *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.* Nature, 2001. **413**(6855): p. 488-94.
11. Kremer Hovinga, J.A., et al., *Thrombotic thrombocytopenic purpura.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17020.
12. Bommer M, W.-G.M., Bohl S, Kuchenbauer F, *The differential diagnosis and treatment of thrombotic microangiopathies.* Dtsch Arztebl Int 2018(115): p. 327–34.
13. Kremer Hovinga, J.A., et al., *Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2010. **115**(8): p. 1500-11; quiz 1662.
14. Coppo, P. and A. Froissart, *Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura beyond therapeutic plasma exchange.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015. **2015**: p. 637-43.
15. Scully, M., et al., *Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies.* Br J Haematol, 2012. **158**(3): p. 323-35.
16. Ledford-Kraemer, M.R., *Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis.* Am J Hematol, 2010. **85**(7): p. 510-4.
17. Tersteeg, C., et al., *Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy.* Circulation, 2014. **129**(12): p. 1320-31.

18. Galanaud, J.P., J.P. Laroche, and M. Righini, *The history and historical treatments of deep vein thrombosis.* J Thromb Haemost, 2013. **11**(3): p. 402-11.
19. Bagot, C.N. and R. Arya, *Virchow and his triad: a question of attribution.* British Journal of Haematology, 2008. **143**(2): p. 180-190.
20. Virchow, R., *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. 1858, Deutsches Textarchiv: Berlin. p. 178.
21. Herold, G., *Innere Medizin*. 2015, Köln: Herold.
22. Marx, R., *Habilitationsschrift*. 1953: Ludwigs-Maximillians Universität München.
23. Bruhn, F., Schäfer, *LaborMedizin - Indikation, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik*. 2008, Stuttgard: Schattauer. 468.
24. Thomas, L., *Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 8. Auflage ed. Vol. Band 1. 2012, Frankfurt am Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH.
25. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion Mechanisms in Platelet Function.* Circulation Research, 2007. **100**(12): p. 1673-1685.
26. Springer, T.A., *von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream.* Blood, 2014. **124**(9): p. 1412-25.
27. Romijn, R.A., et al., *Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain.* J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9985-91.
28. Kroll, M.H., et al., *von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation.* J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1568-73.
29. Hosseinzadegan, H., Tafti, Danesh, *Mechanisms of Platelet Activation, Adhesion and Aggregation*. Vol. 1. 2017: Thrombosis and Haemostasis.
30. Kholmukhamedov, A., J. Rae, and S.M. Jobe, *Cytoplasmic Phospholipase A2 Is Essential in GPVI Signaling Initiated Procoagulant Platelet Formation.* Blood, 2017. **130**(Suppl 1): p. 1068-1068.
31. Sangkuhl, K., et al., *Platelet aggregation pathway.* Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(8): p. 516-21.
32. A Paul, B.Z.S.A.J., Jianguo A Kunapuli, Satya P. *Molecular Mechanism of Thromboxane A 2-induced Platelet Aggregation ESSENTIAL ROLE FOR P 2*. 1999.
33. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin alphaIIbbeta3.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3363-9.
34. Radomski, M.W. and S. Moncada, *Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide.* Thromb Haemost, 1993. **70**(1): p. 36-41.
35. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
36. Hawiger, J., *Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction.* Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 369-72.
37. Ryningen A., H.H., *Biochemistry of Platelet Activation*. Rao G.H.R. (eds) Handbook of Platelet Physiology and Pharmacology. 1999, Boston, MA: Springer.
38. Macfarlane, R.G., *An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier.* Nature, 1964. **202**(4931): p. 498-499.
39. Lenting, P.J., O.D. Christophe, and C.V. Denis, *von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends.* Blood, 2015. **125**(13): p. 2019-28.
40. Michaux, G., et al., *The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies.* Dev Cell, 2006. **10**(2): p. 223-32.

41. Brophy, T.M., et al., *Plasmin Cleaves Von Willebrand Factor at K1491-R1492 in the A1-A2 Linker Region in a Shear- and Glycan-Dependent Manner In Vitro.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(5): p. 845-855.
42. Lenting, P.J., et al., *von Willebrand factor: the old, the new and the unknown.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(12): p. 2428-37.
43. Berntorp, E., *Erik von Willebrand.* Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**: p. S3-4.
44. James, P.D. and D. Lillicrap, *von Willebrand disease: clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies.* Am J Hematol, 2012. **87 Suppl 1**: p. S4-11.
45. Stockschlaeder, M., R. Schneppenheim, and U. Budde, *Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2014. **25**(3): p. 206-16.
46. Ruggeri, Z.M., *Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation.* Best Practice & Research Clinical Haematology, 2001. **14**(2): p. 257-279.
47. Furlan, M., et al., *Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 1998. **91**(8): p. 2839-46.
48. Tsai, H.M. and E.C. Lian, *Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura.* N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1585-94.
49. Sadler, J.E., *A new name in thrombosis, ADAMTS13.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11552-4.
50. Plaimauer, B., et al., *Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13).* Blood, 2002. **100**(10): p. 3626-32.
51. Zheng, X.L., et al., *Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura.* Haematologica, 2010. **95**(9): p. 1555-62.
52. de Groot, R., D.A. Lane, and J.T. Crawley, *The ADAMTS13 metalloprotease domain: roles of subsites in enzyme activity and specificity.* Blood, 2010. **116**(16): p. 3064-72.
53. Gardner, M.D., et al., *A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13.* Blood, 2009. **113**(5): p. 1149-57.
54. GeorgeM.Rodgers, *ADAMTS13 Biology and Disease*. 2015: Springer International Publishing Switzerland
55. Crawley, J.T., et al., *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor.* Blood, 2011. **118**(12): p. 3212-21.
56. Majerus, E.M., et al., *Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity.* J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46643-8.
57. de Groot, R., et al., *Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function.* Blood, 2009. **113**(22): p. 5609-16.
58. de Groot, R., D.A. Lane, and J.T. Crawley, *The role of the ADAMTS13 cysteine-rich domain in VWF binding and proteolysis.* Blood, 2015. **125**(12): p. 1968-75.
59. Jin, S.Y., C.G. Skipwith, and X.L. Zheng, *Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor.* Blood, 2010. **115**(11): p. 2300-10.
60. Ai, J., et al., *The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor.* J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29428-34.
61. Zanardelli, S., et al., *A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF.* Blood, 2009. **114**(13): p. 2819-28.

62. Vomund, A.N. and E.M. Majerus, *ADAMTS13 bound to endothelial cells exhibits enhanced cleavage of von Willebrand factor.* J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 30925-32.
63. Rieger, M., et al., *Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA).* Thromb Haemost, 2006. **95**(2): p. 212-20.
64. Dong, J.F., et al., *ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions.* Blood, 2002. **100**(12): p. 4033-9.
65. Bao, J., et al., *Carboxyl terminus of ADAMTS13 directly inhibits platelet aggregation and ultra large von Willebrand factor string formation under flow in a free-thiol-dependent manner.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(2): p. 397-407.
66. Petri, A., et al., *Crystal structure and substrate-induced activation of ADAMTS13.* Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 3781.
67. Tsai, H.M., *von Willebrand factor, shear stress, and ADAMTS13 in hemostasis and thrombosis.* Asaio j, 2012. **58**(2): p. 163-9.
68. Tsai, H.M., *Shear stress and von Willebrand factor in health and disease.* Semin Thromb Hemost, 2003. **29**(5): p. 479-88.
69. Ruggeri, Z.M. and T.S. Zimmerman, *Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets.* J Clin Invest, 1980. **65**(6): p. 1318-25.
70. Nascimbene, A., et al., *Acquired von Willebrand syndrome associated with left ventricular assist device.* Blood, 2016. **127**(25): p. 3133-41.
71. Crow, S.S. and D.D. Joyce, *Are centrifugal ventricular assist devices the answer to reducing post-implantation gastrointestinal bleeding?* JACC Heart Fail, 2014. **2**(2): p. 146-7.
72. Veyradier, A., et al., *Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management.* Thromb Haemost, 2000. **84**(2): p. 175-82.
73. Budde, U., Drewke,E., Will,K., Schneppenheim,R., *Standardisierte Diagnostik des von-Willebrand-Syndroms.* Hamostaseologie, 2004. **24**(01).
74. Sadler, J.E., et al., *Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(10): p. 2103-14.
75. James, P.D., et al., *ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease.* Blood Advances, 2021. **5**(1): p. 280-300.
76. Swami, A. and V. Kaur, *von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician.* Clin Appl Thromb Hemost, 2017. **23**(8): p. 900-910.
77. Tiede, A., et al., *How I treat the acquired von Willebrand syndrome.* Blood, 2011. **117**(25): p. 6777-85.
78. Dicke, C., et al., *Distinct mechanisms account for acquired von Willebrand syndrome in plasma cell dyscrasias.* Ann Hematol, 2016. **95**(6): p. 945-57.
79. Eikenboom, J.C., F.J. van der Meer, and E. Briet, *Acquired von Willebrand's disease due to excessive fibrinolysis.* Br J Haematol, 1992. **81**(4): p. 618-20.
80. Vincentelli, A., et al., *Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis.* N Engl J Med, 2003. **349**(4): p. 343-9.
81. Stone, M.E., et al., *Current management of von Willebrand disease and von Willebrand syndrome.* Curr Opin Anaesthesiol, 2014. **27**(3): p. 353-8.
82. Moschcowitz, E. *Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries : a hitherto undescribed disease*.

83. Murrin, R.J. and J.A. Murray, *Thrombotic thrombocytopenic purpura: aetiology, pathophysiology and treatment.* Blood Rev, 2006. **20**(1): p. 51-60.
84. Griffin, P.M. and R.V. Tauxe, *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome.* Epidemiol Rev, 1991. **13**: p. 60-98.
85. Brandis, M.K., Helge; Zimmerhackl, Lothar Bernd; Verweyen, Hege; Gerber, Angela, *Das hämolytisch-urämische Syndrom.* Dtsch Arztebl International, 2002. **99**: p. 196-.
86. Upshaw, J.D., Jr., *Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia.* N Engl J Med, 1978. **298**(24): p. 1350-2.
87. Schulman, I., et al., *Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency.* Blood, 1960. **16**: p. 943-57.
88. Tsai, H.M., *Current concepts in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 419-36.
89. Beetari, B.S., Josef M. Krevet,Tanja Fischer,Andreas Ruprecht,Klaus W., *Augenveränderungen bei thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (Moschcowitz-Syndrom).* Klin Monatsbl Augenheilkd, 2002. **219**(06): p. 454-457.
90. Bianchi, V., et al., *Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2002. **100**(2): p. 710-3.
91. Coppo, P., et al., *Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience.* PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10208.
92. Shim, K., et al., *Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress.* Blood, 2008. **111**(2): p. 651-7.
93. Camilleri, R.S., et al., *A phenotype-genotype correlation of ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura patients treated in the United Kingdom.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(9): p. 1792-801.
94. Schwartz, J., et al., *Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue.* J Clin Apher, 2016. **31**(3): p. 149-62.
95. George, J.N. and C.M. Nester, *Syndromes of thrombotic microangiopathy.* N Engl J Med, 2014. **371**(7): p. 654-66.
96. Shatzel, J.J. and J.A. Taylor, *Syndromes of Thrombotic Microangiopathy.* Med Clin North Am, 2017. **101**(2): p. 395-415.
97. Harkness, D.R., et al., *Hazard of platelet transfusion in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Jama, 1981. **246**(17): p. 1931-3.
98. Ridolfi, R.L. and W.R. Bell, *Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature.* Medicine (Baltimore), 1981. **60**(6): p. 413-28.
99. Goel, R., et al., *Platelet transfusions in platelet consumptive disorders are associated with arterial thrombosis and in-hospital mortality.* Blood, 2015. **125**(9): p. 1470-1476.
100. Otrock, Z.K., C. Liu, and B.J. Grossman, *Platelet transfusion in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Vox Sanguinis, 2015. **109**(2): p. 168-172.
101. Onkologie, D.G.f.H.u.m. *Thrombozytentransfusion Leitlinie*. Onkopedia Leitlinien 2011; Available from: https://repository.publisso.de/resource/frl:6400651/data.

102. Owattanapanich, W., et al., *Comparison of the Long-Term Remission of Rituximab and Conventional Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Clin Appl Thromb Hemost, 2019. **25**: p. 1076029618825309.
103. Scully, M., et al., *A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2011. **118**(7): p. 1746-53.
104. Scully, M., et al., *Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.* N Engl J Med, 2019. **380**(4): p. 335-346.
105. Rock, G.A., et al., *Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group.* N Engl J Med, 1991. **325**(6): p. 393-7.
106. Berkowitz, S.D., et al., *Epitope mapping of the von Willebrand factor subunit distinguishes fragments present in normal and type IIA von Willebrand disease from those generated by plasmin.* J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 524-31.
107. Kavran, J.M. and D.J. Leahy, *Coupling antibody to cyanogen bromide-activated sepharose.* Methods Enzymol, 2014. **541**: p. 27-34.
108. Konigsberg, W., *[13] Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol*, in *Methods in Enzymology*. 1972, Academic Press. p. 185-188.
109. Sechi, S. and B.T. Chait, *Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification.* Analytical Chemistry, 1998. **70**(24): p. 5150-5158.
110. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
111. Buchwalow, I., et al., *Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts.* Scientific Reports, 2011. **1**: p. 28.
112. Arakawa, H., M. Maeda, and A. Tsuji, *Chemiluminescence enzyme immunoassay of cortisol using peroxidase as label.* Analytical Biochemistry, 1979. **97**(1): p. 248-254.
113. Kerényi, L. and F. Gallyas, *Über probleme der quantitativen auswertung der mit physikalischer entwicklung versilberten agarelektrophoretogramme.* Clinica Chimica Acta, 1973. **47**(3): p. 425-436.
114. Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.* ELECTROPHORESIS, 1987. **8**(2): p. 93-99.
115. Zheng, X., et al., *Cleavage of von Willebrand Factor Requires the Spacer Domain of the Metalloprotease ADAMTS13.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(32): p. 30136-30141.
116. Dayananda, K.M., et al., *von Willebrand factor self-association on platelet GpIbalpha under hydrodynamic shear: effect on shear-induced platelet activation.* Blood, 2010. **116**(19): p. 3990-8.
117. Zheng, X.L., *ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 211-25.
118. Tao, Z., et al., *Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow.* Blood, 2005. **106**(1): p. 141-3.
119. Jin, S.Y., et al., *von Willebrand factor cleaved from endothelial cells by ADAMTS13 remains ultralarge in size.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1749-52.
120. Kato, S., et al., *Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity.* Transfusion, 2006. **46**(8): p. 1444-52.

121. Federici, A.B., et al., *Proteolysis of von Willebrand factor after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction.* Blood, 1992. **79**(1): p. 38-44.
122. Pillai-Kastoori, L., A.R. Schutz-Geschwender, and J.A. Harford, *A systematic approach to quantitative Western blot analysis.* Anal Biochem, 2020. **593**: p. 113608.
123. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
124. Eaton, S.L., et al., *A guide to modern quantitative fluorescent western blotting with troubleshooting strategies.* J Vis Exp, 2014(93): p. e52099.
125. Prevost, V., et al., *Immunoaffinity purification and gas chromatography-mass spectrometric quantification of 3-alkyladenines in urine: metabolism studies and basal excretion levels in man.* Carcinogenesis, 1993. **14**(2): p. 199-204.
126. Ubrich, N., et al., *Compared stability of Sepharose-based immunoadsorbents prepared by various activation methods.* J Chromatogr, 1992. **584**(1): p. 17-22.
127. Zachariou, M., I. Traverso, and M.T. Hearn, *High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXXI. O-phosphoserine as a new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins.* J Chromatogr, 1993. **646**(1): p. 107-20.
128. Smith, K.T., M.L. Failla, and R.J. Cousins, *Identification of albumin as the plasma carrier for zinc absorption by perfused rat intestine.* Biochem J, 1979. **184**(3): p. 627-33.
129. Balkani, S., et al., *Purification and Characterization of Bovine Serum Albumin Using Chromatographic Method.* Adv Pharm Bull, 2016. **6**(4): p. 651-654.
130. Sevova, T.A. *Not All Bits Are Created Equal*. 2000; Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2589.pdf.
131. Butler, T.A.J., et al., *Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures.* Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 5214821.
132. Faden, F., L. Eschen-Lippold, and N. Dissmeyer, *Normalized Quantitative Western Blotting Based on Standardized Fluorescent Labeling.* Methods Mol Biol, 2016. **1450**: p. 247-58.
133. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 361590.
134. Gerk, P.M., *Quantitative immunofluorescent blotting of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2).* J Pharmacol Toxicol Methods, 2011. **63**(3): p. 279-82.
135. Wilson, C.M., *Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures.* Methods Enzymol, 1983. **91**: p. 236-47.
136. Wilson, C.M., *Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis.* Anal Biochem, 1979. **96**(2): p. 263-78.
137. Taylor, S.C., et al., *A defined methodology for reliable quantification of Western blot data.* Mol Biotechnol, 2013. **55**(3): p. 217-26.
138. Gurtler, A., et al., *Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis.* Anal Biochem, 2013. **433**(2): p. 105-11.
139. Nie, X., et al., *An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction.* Biochemistry and biophysics reports, 2017. **12**: p. 108-113.

140. Hu, X., et al., *Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better "housekeeper".* Oncotarget, 2016. **7**(41): p. 66679-66688.
141. Lee, H.G., et al., *State-of-the-art housekeeping proteins for quantitative western blotting: Revisiting the first draft of the human proteome.* Proteomics, 2016. **16**(13): p. 1863-7.
142. Ferguson, R.E., et al., *Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies.* Proteomics, 2005. **5**(2): p. 566-71.
143. Aldridge, G.M., et al., *The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting.* J Neurosci Methods, 2008. **172**(2): p. 250-4.
144. Janes, K.A., *An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting.* Sci Signal, 2015. **8**(371): p. rs2.
145. McDonough, A.A., et al., *Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot.* Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **308**(6): p. C426-33.
146. Murphy, R.M. and G.D. Lamb, *Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes.* J Physiol, 2013. **591**(23): p. 5823-31.
147. Ghosh, R., J.E. Gilda, and A.V. Gomes, *The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots.* Expert Rev Proteomics, 2014. **11**(5): p. 549-60.
148. Singh, I., et al., *Fluid shear induces conformation change in human blood protein von Willebrand factor in solution.* Biophys J, 2009. **96**(6): p. 2313-20.
149. Baldauf, C., et al., *Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): p. 2096-105.
150. Lippok, S., et al., *Shear-Induced Unfolding and Enzymatic Cleavage of Full-Length VWF Multimers.* Biophys J, 2016. **110**(3): p. 545-554.
151. Dent, J.A., et al., *Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6306-10.
152. Berkowitz, S.D., et al., *Evidence that calpains and elastase do not produce the von Willebrand factor fragments present in normal plasma and IIA von Willebrand disease.* Blood, 1988. **72**(2): p. 721-7.
153. Hassenpflug, W.A., et al., *Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis.* Blood, 2006. **107**(6): p. 2339-45.
154. Howard, M.A., T. Greco, and M. Coghlan, *Cleavage of human von Willebrand factor by porcine pancreatic elastase.* Blood, 1989. **74**(2): p. 673-81.
155. Tati, R., et al., *Neutrophil Protease Cleavage of Von Willebrand Factor in Glomeruli - An Anti-thrombotic Mechanism in the Kidney.* EBioMedicine, 2017. **16**: p. 302-311.
156. Raife, T.J., et al., *Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site.* Blood, 2009. **114**(8): p. 1666-1674.
157. Duranton, J. and J.G. Bieth, *Inhibition of proteinase 3 by [alpha]1-antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(1): p. 57-61.
158. Duranton, J., C. Adam, and J.G. Bieth, *Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor.* Biochemistry, 1998. **37**(32): p. 11239-45.

159. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
160. Wohner, N., et al., *Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways.* Thrombosis Research, 2012. **129**(4): p. e41-e46.
161. Castellino, F.J., *Chapter 648 - Plasmin*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, N.D. Rawlings and G. Salvesen, Editors. 2013, Academic Press. p. 2958-2968.
162. Crawley, J.T.B., et al., *Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin.* Blood, 2005. **105**(3): p. 1085-1093.
163. Shin, Y., et al., *Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by plasmin in human plasma: risk of thrombotic thrombocytopenic purpura.* J Biochem, 2018. **163**(5): p. 381-389.
164. Sadler, J.E., *A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.* Thromb Haemost, 1994. **71**(4): p. 520-5.
165. Verweij, C.L., et al., *Genetic linkage of two intragenic restriction fragment length polymorphisms with von Willebrand's disease type IIA. Evidence for a defect in the von Willebrand factor gene.* J Clin Invest, 1988. **81**(4): p. 1116-21.
166. Lyons, S.E., et al., *Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations.* J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4424-30.
167. Lyons, S.E., et al., *Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations.* Blood, 1994. **83**(6): p. 1551-7.
168. Aponte-Santamaría, C., et al., *Mutation G1629E Increases von Willebrand Factor Cleavage via a Cooperative Destabilization Mechanism.* Biophys J, 2017. **112**(1): p. 57-65.
169. Pérez-Rodríguez, A., et al., *Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis: Lessons from the PCM-EVW-ES Spanish project.* PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0197876.
170. Michiels, J.J., et al., *Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management.* Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(2): p. 401-36.
171. Sarig, G., *ADAMTS-13 in the Diagnosis and Management of Thrombotic Microangiopathies.* Rambam Maimonides Med J, 2014. **5**(4): p. e0026.
172. Bell, W.R., et al., *Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients.* N Engl J Med, 1991. **325**(6): p. 398-403.
173. Hrdinová, J., et al., *Dissecting the pathophysiology of immune thrombotic thrombocytopenic purpura: interplay between genes and environmental triggers.* Haematologica, 2018. **103**(7): p. 1099-1109.
174. Morgand, M., et al., *High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center.* Transfusion, 2014. **54**(2): p. 389-97.
175. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
176. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
177. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.

178. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases.* Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
179. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.* J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
180. Fuchs, T.A., et al., *Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies.* Blood, 2012. **120**(6): p. 1157-64.
181. Pillai, V.G., et al., *Human neutrophil peptides inhibit cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13: a potential link of inflammation to TTP.* Blood, 2016. **128**(1): p. 110-9.
182. Lotta, L.A., et al., *Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura.* Blood, 2012. **120**(2): p. 440-448.
183. Federici, A.B., et al., *Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry.* Thromb Haemost, 2000. **84**(2): p. 345-9.
184. Michiels, J.J., et al., *Immune-mediated etiology of acquired von Willebrand syndrome in systemic lupus erythematosus and in benign monoclonal gammopathy: therapeutic implications.* Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(6): p. 577-88.
185. Federici, A.B., et al., *Treatment of acquired von Willebrand syndrome in patients with monoclonal gammopathy of uncertain significance: comparison of three different therapeutic approaches.* Blood, 1998. **92**(8): p. 2707-11.
186. Takahashi, H., et al., *Excessive fibrinolysis in suspected amyloidosis: demonstration of plasmin-alpha 2-plasmin inhibitor complex and von Willebrand factor fragment in plasma.* Am J Hematol, 1986. **23**(2): p. 153-66.
187. Eikenboom, J.C., F.J. van der Meer, and E. Briët, *Acquired von Willebrand's disease due to excessive fibrinolysis.* Br J Haematol, 1992. **81**(4): p. 618-20.
188. Crippa, M.P., *Urokinase-type plasminogen activator.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 690-4.
189. Duffy, M.J., *The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy.* Curr Pharm Des, 2004. **10**(1): p. 39-49.
190. Shinagawa, A., et al., *Characterization of a myeloma patient with a life-threatening hemorrhagic diathesis: presence of a lambda dimer protein inhibiting shear-induced platelet aggregation by binding to the A1 domain of von Willebrand factor.* Thromb Haemost, 2005. **93**(5): p. 889-96.
191. Kalbhenn, J., et al., *Early diagnosis of acquired von Willebrand Syndrome (AVWS) is elementary for clinical practice in patients treated with ECMO therapy.* J Atheroscler Thromb, 2015. **22**(3): p. 265-71.
192. Kalbhenn, J., et al., *Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery.* J Heart Lung Transplant, 2018. **37**(8): p. 985-991.
193. Barbaro, R.P., et al., *Extracorporeal membrane oxygenation support in COVID-19: an international cohort study of the Extracorporeal Life Support Organization registry.* The Lancet, 2020. **396**(10257): p. 1071-1078.
194. Combes, A., et al., *Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome.* N Engl J Med, 2018. **378**(21): p. 1965-1975.
195. Munshi, L., et al., *Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Respir Med, 2019. **7**(2): p. 163-172.
196. Xiong, Y., B. Manwani, and M. Fisher, *Management of Acute Ischemic Stroke.* Am J Med, 2019. **132**(3): p. 286-291.

197. Long, B. and A. Koyfman, *Current Controversies in Thrombolytic Use in Acute Pulmonary Embolism.* J Emerg Med, 2016. **51**(1): p. 37-44.
198. Armstrong, P.W., et al., *Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation myocardial infarction.* N Engl J Med, 2013. **368**(15): p. 1379-87.

Danksagung

Ich danke meiner Familie und insbesondere meiner Frau, die mich immer wieder unterstützt und motiviert hat weiterzumachen und durchzuhalten. Ohne ihre kontinuierliche, liebevolle und ermutigende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, die durch ihre Förderung und Unterstützung eine so wertvolle Grundlage in mein Leben hineingelegt haben, auf der ich nun weiter bauen darf. Zuletzt danke ich meiner Tochter. Ihre Anwesenheit gab mir für die letzten Monate der Arbeit immer Motivation diese zu Ende zu bringen.

Ich danke meinen beiden Betreuern sowie bei meiner Doktormutter. Ich danke für die großartige Unterstützung, die vielen Treffen, die Zeit, die sich alle drei genommen haben, sowie für meine Förderung.

Ich danke allen Mitarbeitern der AG Jurk, die mir immer wieder Rat und praktische Hilfe gegeben haben sowie ein besonderes Gefühl in der AG Jurk willkommen zu sein. Ein besonderer Dank gilt dabei den beiden technischen Assistentinnen, die beide viel Arbeit mit in dieses Projekt investiert haben.

Ich danke meinem guten Freund, der mir Hilfe bei den sprachlichen und grammatikalischen Korrekturen gab.

Darüber hinaus danke ich dem Scripps Research Institute in La Jolla USA für die großzügige Zurverfügungstellung von Antikörpern für unsere Arbeit.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Johannes Irle
Geburtstag:	15.09.1985
Geburtsort:	Darmstadt
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Bildungsweg und wissenschaftliche Ausbildung

10/2011 – 2018: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München und an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- 1. Staatsexamen, April 2014
- 2. Staatsexamen, Oktober 2017
- 3. Staatsexamen, November 2018
    - Gesamtabschlussnote: 2,0

05/2016 – 07/2022:
Doktorand an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz am Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
„Untersuchung zur in vivo proteolytischen Spaltung des von-Willebrand-Faktors bei verschiedenen Erkrankungen“

- Tag der Promotion 12.07.2022

10/2006 – 08/2010: Ausbildung zum medizinisch-technischen Laborassistenten an der staatlichen Lehranstalt für medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Abschlussnote: 1,3

09/1996 – 06/2005: Allgemeine Hochschulreife an der Eleonorenschule, Darmstadt

- Abschlussnote: 2,4

Beruflicher Werdegang

01/2019 – dato: Assistenzarzt der Anästhesie und Intensivmedizin an der Hunsrück Klinik Simmern

- davon mindestens sechs Monate intensivmedizinische Erfahrung
- Zertifikat GRC NLS Provider 11/2021
- Zusatzbezeichnung Notfallmedizin 04/2022

08/2016 – 10/2016: Medizinisch-technischer Laborassistent am CTH der Universitätsmedizin Mainz, AG Jurk/ Walter im Rahmen der Dissertationsarbeit

10/2010 – 09/2011: Medizinisch-technischer Laborassistent im Klinikum Darmstadt GmbH

Kongressbeiträge

07/2017: Poster ISTH 2017 Berlin, *„Acquired von Willebrand Disease (aVWS) in Plasma Cell Dyscrasias (PCD): Variable Underlying Pathophysiology as Evidenced by the Analysis of Proteolytic von Willebrand Factor (VWF) Cleavage Fragments"*

02/2017: Poster GTH 2017 Basel, *„Analysis of proteolytic von Willebrand factor (VWF) fragments in patients with VWF-related diseases"*