

# Tierexperimentelle Untersuchungen zu Auslösefaktoren der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP)

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
( Dr. rer. nat. )



Am Fachbereich Biologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität  
Mainz

vorgelegt von  
**Cecilia Maria Perera**  
Geboren in Denver, Colorado (USA)

Mainz, 2019

Aus dem  
Centrum für Thrombose und Hämostase  
und dem Fachbereich Biologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

D77

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2020

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1 Die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura.....</b>             | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Die Geschichte der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura ..... | 2         |
| 1.1.2 Einteilung der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura.....      | 3         |
| 1.1.3 Symptome der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura .....       | 5         |
| 1.1.4 Therapie der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura .....       | 7         |
| <b>1.2 Der Von-Willebrand-Faktor .....</b>                               | <b>7</b>  |
| <b>1.3 Die Protease ADAMTS13.....</b>                                    | <b>12</b> |
| 1.3.1 Autoantikörper gegen ADAMTS13 .....                                | 15        |
| <b>1.4 Die Rolle von ADAMTS13 .....</b>                                  | <b>16</b> |
| <b>1.5 Trigger der TTP.....</b>                                          | <b>17</b> |
| 1.5.1 Rekombinanter Von-Willebrand-Faktor .....                          | 17        |
| 1.5.2 Wilfactin .....                                                    | 18        |
| 1.5.3 Kogenate® .....                                                    | 19        |
| 1.5.4 Histone.....                                                       | 19        |
| 1.5.5 Lipopolysaccharide.....                                            | 20        |
| 1.5.6 Quensyl® .....                                                     | 21        |
| 1.5.7 Ticlopidin.....                                                    | 22        |
| 1.5.8 Gemcitabin.....                                                    | 23        |
| 1.5.9 Mitomycin C .....                                                  | 25        |
| <b>1.6 Literaturübersicht: Trigger der TTP .....</b>                     | <b>26</b> |
| <b>1.7 Biomarker der TTP.....</b>                                        | <b>27</b> |

## 2 Material und Methoden

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1 Das Tiermodell .....</b>          | <b>29</b> |
| <b>2.2 Material .....</b>                | <b>31</b> |
| 2.2.1 Geräte .....                       | 31        |
| 2.2.2 Verbrauchsmaterialien .....        | 32        |
| 2.2.3 Chemikalien .....                  | 33        |
| 2.2.4 Antikörper und Primer .....        | 35        |
| 2.2.5 Kitsysteme .....                   | 35        |
| 2.2.6 Puffer und Gele .....              | 36        |
| <b>2.3 Methoden.....</b>                 | <b>37</b> |
| 2.3.1 PCR-Genotypisierung.....           | 37        |
| 2.3.2 Retroorbitale Blutabnahme .....    | 38        |
| 2.3.3 Plasmagewinnung.....               | 38        |
| 2.3.4 Blutaussstriche.....               | 39        |
| 2.3.5 Trigger-Untersuchungen.....        | 40        |
| 2.3.6 Lactatdehydrogenase-Assay.....     | 42        |
| 2.3.7 Troponinbestimmung.....            | 42        |
| 2.3.8 Von-Willebrand Faktor.....         | 43        |
| <b>2.4 Statistische Auswertung .....</b> | <b>46</b> |

## 3 Ergebnisse

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>3.1 Genotypisierung .....</b>     | <b>47</b> |
| <b>3.2 VWF-Multimeranalyse .....</b> | <b>47</b> |

|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3.3 Triggerversuche .....</b>                                                  | <b>48</b>  |
| 3.3.1 Titration mit VWF .....                                                     | 48         |
| 3.3.2 Gabe von Wilfactin.....                                                     | 57         |
| 3.3.3 Gabe von Kogenate® .....                                                    | 58         |
| 3.3.4 Gabe von Histonen .....                                                     | 60         |
| 3.3.5 Gabe von LPS .....                                                          | 65         |
| 3.3.6 Gabe von Quensyl®(Hydroxychloroquin).....                                   | 70         |
| 3.3.7 Gabe von Ticlopidin .....                                                   | 72         |
| 3.3.8 Gabe von Gemcitabin .....                                                   | 74         |
| 3.3.9 Gabe von Mitomycin C .....                                                  | 76         |
| <b>3.4 Blutausstriche .....</b>                                                   | <b>79</b>  |
| Blutausstriche nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF .....                                | 79         |
| Blutausstriche nach Gabe von 250 IE/kg rhVWF .....                                | 81         |
| Blutausstriche nach Gabe von 25 mg/kg Histonen .....                              | 81         |
| Blutausstriche nach Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg VWF .....            | 82         |
| Blutausstriche nach Gabe von 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg VWF .....                  | 83         |
| Blutausstriche nach Gabe von 1 mg/kg LPS .....                                    | 83         |
| Blutausstriche nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl® .....                             | 84         |
| Blutausstriche nach Gabe von Gemcitabin.....                                      | 84         |
| <b>3.5 Einflussfaktoren auf die Plättchenzahl der Maus .....</b>                  | <b>85</b>  |
| <b>3.6 Limitationen .....</b>                                                     | <b>87</b>  |
| <b>4 Diskussion .....</b>                                                         | <b>90</b>  |
| 4.1 Die Maus als Modell für den Menschen.....                                     | 90         |
| 4.2 Titration mit rhVWF .....                                                     | 92         |
| 4.3 Die Gabe von humanem plasmatischen VWF bei Mäusen .....                       | 92         |
| 4.4 Die Gabe von Faktor VIII bei ADAMTS13KO-Mäusen.....                           | 94         |
| 4.5 Die Rolle von Entzündungen bei der TTP am Beispiel von Histonen und LPS ..... | 95         |
| 4.5.1 Die Auswirkungen von ADAMTS13-Defizienz bei Gabe von Histonen .....         | 95         |
| 4.5.2 Die Auswirkungen von ADAMTS13-Defizienz bei Gabe von LPS .....              | 99         |
| 4.6 Chinin und Quensyl®(Hydroxychloroquin): TTP oder TMA? .....                   | 101        |
| 4.7 Ticlopidin.....                                                               | 105        |
| 4.8 Die Gabe von Gemcitabin in ADAMTS13KO-Mäusen.....                             | 108        |
| 4.9 Die Wirkung von Mitomycin auf ADAMTS13KO-Mäuse.....                           | 111        |
| 4.10 Troponin I- Messung: Ein wichtiger Biomarker für die TTP.....                | 113        |
| 4.11 Die LDH-Messungen mit Citrat-Plasma.....                                     | 116        |
| 4.12 Die TTP, ein Zusammenspiel vieler Faktoren .....                             | 117        |
| 4.13 Ausblick: Neue Therapieansätze.....                                          | 123        |
| <b>5 Zusammenfassung/Abstract .....</b>                                           | <b>126</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis.....</b>                                                | <b>127</b> |
| <b>7 Anhang .....</b>                                                             | <b>160</b> |
| Plättchen-, Troponin- und LDH-Werte im Überblick .....                            | 160        |
| Weitere Trigger der TTP im Überblick.....                                         | 160        |
| Abbildungsverzeichnis .....                                                       | 166        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |                                                                                                         |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADAMTS13       | <i>engl.</i> A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif 13                      |
| aPTT           | aktivierte partielle Thromboplastinzeit                                                                 |
| ALT            | Alanin-Aminotransferase                                                                                 |
| AS             | Aminosäure                                                                                              |
| AST            | Aspartat-Aminotransferase                                                                               |
| ATRA           | <i>engl.</i> All-Trans-Retinoid Acid                                                                    |
| CD46           | <i>engl.</i> Cluster of Differentiation 46                                                              |
| CHO-Zellen     | <i>engl.</i> Chinese Hamster Ovary Cells                                                                |
| CLEC4M         | <i>engl.</i> C-type Lectin Domain family 4 member M; auch CD299 genannt                                 |
| cTnI           | <i>engl.</i> cardiac Troponin I (kardiales Troponin I)                                                  |
| DIC            | <i>engl.</i> Disseminated Intravascular Coagulopathy, deutsch : disseminierte intravasale Koagulopathie |
| EZM            | Extrazelluläre Matrix                                                                                   |
| FFP            | <i>engl.</i> Fresh Frozen Plasma                                                                        |
| GP             | Glykoprotein                                                                                            |
| HCQ            | Hydroxychloroquin                                                                                       |
| HE-Färbung     | Hämatoxylin-Eosin-Färbung                                                                               |
| HLA            | <i>engl.</i> Human Leukocyte Antigen                                                                    |
| HUS            | Hämolytisch-urämisches Syndrom                                                                          |
| IAP            | Intrazisternale A-Typ Partikel                                                                          |
| IL             | Interleukin                                                                                             |
| KO             | Knockout                                                                                                |
| LDH            | Lactatdehydrogenase                                                                                     |
| LRP1           | <i>engl.</i> Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1                                         |
| MAPK           | <i>engl.</i> Mitogen Activated Protein-Kinase                                                           |
| MVEC           | <i>engl.</i> Mikrovascular Endothelial Cells                                                            |
| NF- $\kappa$ B | <i>engl.</i> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells                             |
| PTT            | <i>engl.</i> Partial Thromboplastin Time; Partielle Thromboplastin Zeit                                 |
| PAMP           | <i>engl.</i> Pathogen Associated Molecular Patterns                                                     |
| PAR            | <i>engl.</i> Protease Activated Receptor                                                                |
| Plt            | Plättchen                                                                                               |
| rhVWF          | rekombinanter humaner Von-Willebrand-Faktor                                                             |
| Siglec 5       | Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin 5                                                                    |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor $\alpha$                                                                             |
| TMA            | Thrombotische Mikroangiopathie                                                                          |
| tPA            | <i>engl.</i> Tissue-Plasminogen-Activator                                                               |
| TSP1           | Thrombospondin Typ 1                                                                                    |
| TTP            | Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura                                                                |
| UL-VWF         | Ultralanger Von-Willebrand-Faktor                                                                       |
| USS            | Upshaw-Schulman-Syndrom                                                                                 |
| VWF            | Von-Willebrand-Faktor                                                                                   |
| WPK            | Weibel-Palade-Körperchen                                                                                |
| WT             | Wildtyp                                                                                                 |



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP)

Die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), auch Moschcowitz-Syndrom genannt, ist eine seltene und schwere systemische Erkrankung. Sie wurde erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts vom amerikanischen Arzt Moschcowitz beschrieben (Moschcowitz, 1952). Die TTP tritt meist akut auf, wobei Schübe typisch sind. Charakteristisch für die TTP ist die Bildung zahlreicher Mikrothrombosen in den arteriellen Kapillaren, welche unter anderem zu schweren Ischämien führen. Diese TTP-typischen Mikrothrombosen bestehen vor allem aus großen Von-Willebrand-Faktor-Multimeren (VWF-Multimere) und wenig Fibrin (Asada et al., 1985). Eine unbehandelte TTP führt zu über 90% Wahrscheinlichkeit zum Tod (Levy et al., 2005). Schnelles diagnostisches und therapeutisches Handeln ist daher lebensnotwendig. 45% der Patienten, die einen TTP-Schub erleiden, erfahren später weitere Schübe (Bettoni et al. 2012). Wie eine Studie der Uniklinik Mainz belegte, stellt für TTP-Patienten das Wissen, dass sie jederzeit einem TTP-Schub ausgeliefert sind, zusätzlich eine starke psychische Belastung dar (Falter, Alber, & Scharrer, 2013). Bei der TTP sind die Prothrombinzeit, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Konzentration der D-Dimere und des Fibrinogens nicht auffällig erhöht (Humphreys et al., 2004; Saif & McGee, 2005), was deutlich macht, dass es sich bei der TTP nicht um eine Gerinnungsstörung handelt. Man geht von einer hohen Dunkelziffer von Erkrankungen aus (Scully et al., 2008). Scully et al. kommen auf eine Hochrechnung von 6 Fällen pro 1 Million in Großbritannien (Scully et al. 2008). Mariotte berichtet von einer Prävalenz der TTP von 13 pro 1 Millionen Einwohner in Frankreich (Mariotte et al., 2016). Die Inzidenz einer TTP wird weltweit auf weniger als 20 Fälle pro 1 Million geschätzt (Sarode et al., 2014). In demographischen Studien hat sich gezeigt, dass Frauen 2-3fach so häufig an einer TTP erkranken wie Männer. Außerdem sind Menschen afrikanischer Herkunft 9-mal so häufig betroffen wie Menschen kaukasischer Herkunft (George et al., 2008).

Lange war die Pathogenese der TTP unbekannt und erst 2001 identifizierten verschiedene Arbeitsgruppen, die verminderte Aktivität bzw. den Mangel der Protease ADAMTS13 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13) als maßgeblich an der Krankheit beteiligt (Levy et al., 2005). Wie weitere Beobachtungen zeigten, scheint ein TTP-Schub aber nicht zwingend mit einer ADAMTS13-Defizienz zusammenzuhängen. Bei Patienten mit hereditärer TTP, bei denen der ADAMTS13-Mangel einen Dauerzustand darstellt, können TTP-Schübe bisweilen scheinbar zufällig auftreten und sind nicht vorhersehbar. Die Frage, welche weiteren Faktoren zum Ausbruch einer TTP führen, ist bisher nur unzureichend

geklärt. Bekannt ist mittlerweile, dass die TTP unter anderem durch Infektionen und bestimmte Medikamente getriggert werden kann. Für die TTP sind in der Literatur zahlreiche Trigger belegt (siehe Tabelle 16 im Anhang, Seite 160). Die erworbene TTP ist im Gegensatz zur hereditären TTP eine Autoimmunerkrankung, welche durch Bildung von ADAMTS13-Hemmkörpern zu einer verminderten Aktivität der Protease führt.

### **1.1.1 Die Geschichte der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura**

Die TTP wurde erstmals 1924 vom Arzt Eli Moschcowitz beschrieben. Ein bis dahin gesundes junges Mädchen war mit Fieber und starken Kopfschmerzen eingeliefert worden. Später fiel sie in ein Koma, ihre Organe versagten und das Mädchen verstarb binnen zwei Wochen. Bei der Autopsie des Mädchens entdeckte Moschcowitz in den Mikrokapillaren verschiedener Organe mehrere „hyalinreiche“ Mikrothrombosen. Moschcowitz ging davon aus, dass diese Mikrothrombosen für den plötzlichen und schweren Krankheitsverlauf des Mädchens verantwortlich waren (Moschcowitz, 1952).

Im Jahr 1965 veröffentlichten Amorosi und Ultmann Befunde, die näheren Aufschluss über die TTP bringen sollten (Amorosi & Ultmann, 1965). Es wurden 250 alte Fälle sowie zusätzlich 16 neue Fälle der TTP analysiert. Auffällig waren die sehr unterschiedlichen Krankheitsgeschichten der einzelnen Patienten; es konnte keine einheitliche Ursache für den Ausbruch und den Verlauf der Erkrankung gefunden werden. Zusätzlich waren die beobachteten Symptome, abhängig vom Patienten, verschieden stark ausgeprägt oder teilweise nicht vorhanden. Fünf Symptome stachen dennoch heraus und wurden von Amorosi und Ultmann aufgrund ihrer Häufigkeit hervorgehoben. Diese Symptome waren 1. Fieber, 2. Blutungen/ Petechien, 3. Anämie, 4. neurologische Manifestationen und 5. Störungen der Nieren. Wie genau TTP therapiert werden sollte, war noch völlig unbekannt. 90% der TTP-Patienten starben. Es wurden mehrere Möglichkeiten für eine Therapie genannt, u. a. die Splenektomie (Amorosi & Ultmann, 1965).

Nachdem Bukowski (Bukowski, 1985) eine Therapie mit „Fresh Frozen Plasma“ vorschlug und seit 1961 einen Plasmaaustausch mehrfach erfolgreich angewandt hatte, bestätigten auch Bell et al. in einer Studie mit 108 Patienten, dass ein Plasmaaustausch das Überleben von Patienten mit einem TTP-Anfall deutlich verbesserte (Bell et al., 1991). Spätestens von diesem Zeitpunkt an, etablierte sich der Plasmaaustausch als wirksame Behandlung bei einem TTP-Schub.

Da Moake (Moake et al., 1982) ungewöhnlich große Von-Willebrand-Faktor-Multimere im Plasma von TTP Patienten beschrieb, wurde in der TTP-Forschung nach einer VWF-spaltenden Protease gesucht. Die Arbeitsgruppen um Furlan und Tsai bestätigten 1996 unab-

hängig voneinander das Vorhandensein einer solchen Protease ( Furlan, Robles & Lämmle 1996; Tsai 1996). Erst 2001 wurde diese Protease vollständig charakterisiert und erhielt den Namen ADAMTS13. 2003 beschrieb Furlan die mangelnde Aktivität der VWF-spaltenden Protease ADAMTS13 sowie das Vorkommen von ADAMTS13-Antikörpern in Patienten (Furlan, 2003). Noch heute ist die TTP relativ unbekannt und es besteht in der Forschung, bei Ärzten und Patienten weiterhin großer Forschungs- und Aufklärungsbedarf. So haben sich in den letzten Jahren weltweit TTP-Zentren gebildet, die sich um TTP-Patienten kümmern und Patienten und Ärzten eine Plattform zum Informations- und Erfahrungsaustausch bieten.

### 1.1.2 Einteilung der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura

Die TTP gehört zu den thrombotischen Mikroangiopathien (TMA). Die bekanntesten Formen der TMA sind das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) und die TTP. TMAs sind gekennzeichnet durch schwere Thrombozytopenie, mikroangiopathische hämolytische Anämie (MAHA) und Organischämien durch Mikrothrombosen.

Aufgrund des ähnlichen Erscheinungsbildes von TTP und HUS sind diese nicht immer eindeutig zu unterscheiden und es kommt häufig zu Verwechslungen. Insbesondere in der alten Literatur ist daher oft in Fallberichten der Begriff „TTP-HUS“ zu finden. Im Gegensatz zur TTP wird das HUS durch hämorrhagische E. coli Stämme hervorgerufen. Dabei ist die Nierenschädigung sehr stark ausgeprägt. Bei HUS unterscheidet man a-HUS (atypisches HUS) und STEC-HUS (Shigatoxin Escherichia Coli-HUS). STEC-HUS wird durch das Shigatoxin von E.coli Stämmen verursacht. Das seltener vorkommende a-HUS tritt vorwiegend im Kindesalter auf. Bei a-Hus gibt es oft keine Hinweise auf eine Infektion und im Gegensatz zu STEC-HUS kann es chronisch werden. Oft werden bei a-HUS genetische Defekte des Komplementsystems gefunden (Waters & Licht, 2011). Eine Erhöhung des Kreatininspiegels im Blut deutet auf ein HUS hin und ist ebenfalls ein Kriterium zur Unterscheidung zwischen TTP und HUS. Bei der TTP unterscheidet man zwischen der primären TTP und der sekundären TTP.

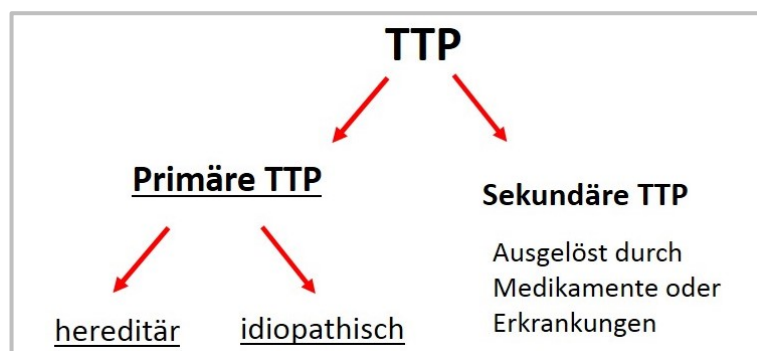


Abbildung 1: Einteilung der TTP in die typische primäre und die sekundäre TTP. Wie bei der idiopathischen TTP können bei der sekundären TTP auch Autoantikörper gebildet werden.

### Die primäre TTP

Die primäre TTP wird aufgeteilt in die hereditäre TTP, auch Upshaw-Schulman-Syndrom (USS) genannt, und die idiopathische TTP. Bei der hereditären TTP handelt es sich um eine genetische Störung. Etwa 5-10% der TTP-Patienten leiden unter dieser Form der TTP (Galbusera et al., 2009; Lotta et al., 2010; Mariotte et al., 2016). Betroffene leiden von Geburt an unter einer stark verminderten Aktivität der ADAMTS13-Protease, was auf Mutationen im ADAMTS13-Gen zurückzuführen ist. Der Defekt wird autosomal rezessiv vererbt. Es sind über 150 verschiedene Mutationen im ADAMTS13-Gen bekannt, welche homo- oder heterozygot auftreten können (Kiss, 2010; Mansouri Taleghani et al., 2013). Die Mutationen 4143insA und R1060W sind besonders auffällig und sind in Europa und auf anderen Kontinenten verteilt (Hovinga & Lämmle, 2012). Die Mutation 4143insA ist vermehrt in Skandinavien, am Baltischen Meer, und in Mähren zu finden und lässt bei den Betroffenen auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund schließen. Seltener findet man die Mutation auch in den USA, Kanada und Kroatien (Schneppenheim et al., 2006). 4143insA ist eine Nukleotid-Insertion in Exon 29, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens und so zu einem vorzeitigen Abbruch an der AS 1386 führt.

Die Mutation R1060W findet man in Europa und den USA. R1060W ist eine Missense-Mutation in Exon 24 Arg1060Trp und löst häufig erst im Erwachsenenalter eine TTP aus (Mansouri Taleghani et al., 2013).

In Japan ist die ADAMTS13-Mutation P475S, die eine verminderte Aktivität der Protease bewirkt, sehr häufig. Auf den Daten einer Studie beruhend, tragen wahrscheinlich bis zu 10% der japanischen Bevölkerung diese Mutation heterozygot in ihrem Genom (Kokame et al., 2002). Weitere bekannte Mutationen sind P353L und P457L, welche zu einer teilweisen Beeinträchtigung der Sekretion und einer niedrigeren Aktivität führen (Manea et al., 2007).

Charakteristisch für die hereditäre TTP ist, dass sie sich schon oft im Kleinkindalter manifestiert. Im Labor findet man bei der hereditären TTP keine Autoantikörper gegen ADAMTS13. TTP-Schübe treten in unregelmäßigen Abständen auf. Zur Behandlung eines akuten Schubs bei der hereditären TTP reicht - im Gegensatz zur sekundären TTP - oftmals die Gabe von Plasmainfusionen aus.

Die häufigere idiopathische TTP wird durch Autoantikörper verursacht. Die idiopathische TTP ist die häufigste Form der TTP. In einer Studie von Scully zeigte sich, dass 77% der untersuchten TTP Fälle eine idiopathische TTP darstellten (Scully et al., 2008). Bei den Autoantikörpern kann es sich um Hemmkörper handeln, die die Funktion von ADAMTS13 einschränken oder um nicht neutralisierende Antikörper, deren Mechanismus noch nicht vollständig erforscht ist. Extrem niedrige ADAMTS13-Aktivität ( $\leq 5\%$ ) ist vor allem aufgrund

von Antikörpern bei der TTP zu finden und bestätigt oft das Vorliegen einer idiopathischen bzw. sekundären TTP (Scully et al., 2008). Im Kapitel „Autoantikörper gegen ADAMTS13“ (Seite 15) wird näher auf die Antikörper eingegangen.

### Die sekundäre TTP

Sekundäre Formen der TTP können durch verschiedene Erkrankungen oder Medikamente ausgelöst werden (siehe Tabelle 16, Seite 160). Diese Ausprägung grenzt sich von der primären TTP durch eine weniger erniedrigte Aktivität der ADAMTS13-Protease ab. Medikamente, welche häufig mit der sekundären TTP assoziiert werden, sind unter anderem Thienopyridine, wie Ticlopidin und Clopidogrel, Chinine, verschiedene Chemotherapeutika und Calcineurin-Inhibitoren. Eine Schwangerschaft, Kollagenose und Vaskulitis begünstigen ebenfalls das Auftreten einer TTP (Sadler 2006; Zakarija et al. 2004). Meist tritt die erworbene TTP erst im Erwachsenenalter auf, sie kann aber auch schon bei Kindern auftreten.

### **1.1.3 Symptome der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura**

Nach Mariotte zählen neurologische Störungen, Blutungen, Thrombozytopenie und die Anämie zu den typischsten und wichtigsten Symptomen und Befunden der TTP (Hellmann et al. 2010; Mariotte et al., 2016).



Abbildung 2: Typische Petechien am Unterschenkel eines TTP-Patienten.

Die neurologischen Störungen äußern sich häufig in Kopfschmerzen, Schwindel und Verwirrheitszuständen. Diese können von vorübergehender oder anhaltender Dauer sein (Shenkman & Einav, 2014). Sie treten in etwa 65% der Patienten auf (Hellmann et al., 2010). Die Blutungen sind häufig als Purpura zu erkennen (Amorosi & Ultmann, 1965). Purpura sind kleine Einblutungen in der Haut, die durch Verletzungen der Kapillaren auftreten und häufige Nebenerscheinung einer Thrombozytopenie sind.

Die ausgeprägte Thrombozytopenie ( $\leq 10,000/\mu\text{l}$ ) (Shenkman & Einav, 2014) kommt durch das Haften der Thrombozyten an den vermehrt auftretenden ultralangen VWF-Multimeren (UL-VWF-Multimere) und dem dadurch entstehenden hohen Verbrauch der Plättchen zustande. Des

Weiteren tritt bei vielen Patienten aufgrund von Hämorrhagien und der Zerstörung von Erythrozyten eine Anämie auf.

### Labordiagnose

Da die Symptome einer TTP oft nicht eindeutig zuordenbar sind, ist es bei Verdacht auf TTP besonders wichtig, diese durch eine Labor-Diagnose zu sichern. Die wichtigsten Verfahren sind hierbei folgende:

#### Die Messung der Plättchenzahl

Durch die Messung der Plättchenzahl kann eine Thrombozytopenie erkannt werden. TTP-Patienten haben in der Regel Plättchenwerte von  $<10.000-30.000/\mu\text{l}$  (Crawley & Scully 2013). (Normalwert:  $150.000-400.000/\mu\text{l}$ )

#### Die Anfertigung von Blutausstrichen

In den Blutausstrichen von TTP-Patienten findet man typischerweise Fragmentozyten (zerstörte Erythrozyten) mit einer Häufigkeit von über 15‰ (Hellmann et al., 2010). Es handelt sich hierbei um eine mechanische, nicht immunologische Schädigung der Erythrozyten.



Abbildung 3: Blutausstrich mit Fragmentozyten bei einem TTP-Patient, entnommen aus Poddar & Wang, 2013.

#### Die Messung des Hämoglobinwertes

Bei TTP-Patienten findet man einen Hämoglobinwert von unter 10 g/dl (Normalwert zwischen 12 und 18 g/dl). Er lässt sich auf die Zerstörung von Erythrozyten und auf Hämorrhagien zurückführen und ist ein wichtiges sekundäres Merkmal der TTP (Crawley & Scully 2013).

#### Die Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität und ADAMTS13-Antikörpern

Die Messung der ADAMTS13-Aktivität gibt Aufschluss darüber, ob die Protease vorhanden und aktiv ist. Bei einer Aktivität von unter 10% spricht man von einer schweren ADAMTS13-Defizienz. Die Aktivität wird als sehr stark vermindert gewertet, wenn sie weniger als 5% beträgt. Die Bestimmung von ADAMTS13-Antikörpern ist ein wichtiger Parameter, der Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit eines wiederkehrenden Schubs gibt (Bettoni et

al., 2012). Sind Autoantikörper vorhanden, handelt es sich um eine erworbene oder idiopathische TTP.

#### Die Bestimmung der LDH- und Troponin-Konzentration

Weitere Marker, welche bei einer Diagnose mituntersucht werden sollen, sind LDH und Troponin (Scully, 2012). Werden hohe Konzentrationen dieser Marker gemessen, weist dies auf Zellschäden, die bei der TTP durch die Mikrothrombosen entstehen.

#### **1.1.4 Therapie der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP)**

Bei Behandlung eines TTP-Schubs ist ein Plasmaaustausch mit „Fresh Frozen Plasma“ (FFP) noch immer die erste Wahl bei idiopathischer und sekundärer TTP. Zum einen kann dadurch dem Körper die Protease ADAMTS13 zugeführt werden, was einen vermehrten Abbau der Mikrothrombosen zur Folge hat, zum anderen werden mögliche ADAMTS13-Hemmkörper entfernt.

Eine Protein A-Immunadsorption, bei welcher Pathogene und Autoantikörper aus dem körpereigenem Plasma mithilfe von Protein A adsorbiert und entfernt werden, wurde in der Vergangenheit ebenfalls erfolgreich angewandt (Kasper et al., 2007).

Früher wurde bei erworbener TTP häufig die Splenektomie zur Eliminierung der B-Lymphozyten durchgeführt (Hill & Cooper, 1968; Kappers-Klunne et al., 2005; Rodriguez-Bano et al., 1997; Schneider et al., 1985; Umemura et al., 2013; Veltman et al., 1995). Diese drastische Maßnahme findet heute nur noch vereinzelt statt. Die Therapie mit Rituximab, einem CD20-Antikörper, welcher sich gegen die B-Lymphozyten richtet, hat sich als hilfreich erwiesen (Albaramki, Teo & Alexander, 2009; Rinott et al., 2015; Scully, 2012). Das Immunsuppressivum wird oft in Verbindung mit einem Plasmaaustausch verwendet. Weitere Immunsuppressiva, die Anwendung gegen TTP finden, sind Corticosteroide.

Zusätzlich werden supportive Therapien, zum Beispiel Erythrozytentransfusionen, durchgeführt.

## 1.2 Der Von-Willebrand-Faktor

### Der Von-Willebrand-Faktor

Der Von-Willebrand-Faktor (VWF) wurde nach dem finnischen Arzt Erik Adolf von Willebrand benannt. Dieser beschrieb 1926 erstmals eine angeborene Blutungsneigung, welche sich von der damals bekannten Hämophilie A unterschied. Das „Von-Willebrand-Syndrom“ oder die „Von-Willebrand-Krankheit“, wie die Krankheit heute genannt wird, war charakterisiert

durch den Mangel eines Plasmaproteins, dem „Von-Willebrand-Faktor“ (De Meyer et al., 2009).

### Eigenschaften

Der VWF ist ein multifunktionelles Glykoprotein, das in den Megakaryozyten und den Endothelzellen exprimiert wird. Neben der Aufgabe als Trägerprotein für den Faktor VIII spielt der VWF eine wichtige Rolle in der zellulären Hämostase (Sadler, 1998). Mit einer Größe von bis zu 20.000 kDa ist der VWF das größte im Plasma vorkommende Polymer (Sadler, 1998). Die Durchschnittskonzentration von VWF im Plasma von Menschen beträgt etwa 50-200 IE/dL im Plasma (James&Goodeve, 2011). Der VWF wird konstant und durch Reize stimuliert, ausgeschieden. Ungebundener VWF erfährt eine schwächere Scherkraft, was ihm erlaubt, eine gefaltete, globuläre Form anzunehmen. In der gefalteten Form sind verschiedene Bindestellen nicht frei zugänglich (Crawley et al., 2009). Nur unter hohem Scherstress, welcher insbesondere in den Kapillaren vorhanden ist, entfaltet sich der VWF, wodurch er die Bindestellen für ADAMTS13 und Plättchen freilegt (Schneider et al., 2007). Der VWF kann sich mit subendotheliale Kollagen über Bindestellen in der A3 Domäne verankern (De Ceunynck, 2013). In vitro wurde gezeigt, dass die VWF-Multimere sich über eine Arg-Gly-Asp-Sequenz (auch als RGD-Sequenz bekannt) mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  auf dem Endothel verbinden und als Stränge, welche in Richtung des Blutflusses treiben, zu beobachten sind (Huang et al., 2009). Im Plasma vorkommender VWF sowie durch Aktivierung der Thrombozyten sezernierter VWF können an bereits gebundene VWF-Stränge binden (Ulrichs et al., 2005). Dieser Vorgang spielt bei der Hämostase eine wichtige Rolle, denn dadurch vergrößert sich die Adhäsionsfläche für die Plättchen und eine rasche Hämostase wird gewährleistet. Die Konzentration des VWF im Plasma liegt zwischen 5 und 10  $\mu\text{g/mL}$  (Casari et al., 2013), wobei es hier, abhängig vom Individuum, starke Konzentrationsschwankungen gibt. Zusätzlich ist die Konzentration des VWF im Blut abhängig von der Blutgruppe, dem Alter, Stress und Infektionen.

### Die Synthese des VWF

Der VWF wird als Vorläuferprotein in den Megakaryozyten und den Weibel-Palade-Körperchen (WPK) des Endothels gebildet. Dort hat er zunächst die Form eines Pre-Pro-Proteins mit einer Länge von 2813 Aminosäuren (Casari et al., 2013; Ruggeri, 1997). Die Struktur des Pre-Pro-Proteins wurde 2012 von Zhou et al. neu definiert und wie folgt veröffentlicht: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (Zhou et al., 2012). Dieses Pre-Pro-Protein wird in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort findet eine Glykosylierung und eine über die CK Domäne (Cystein-Knot) vermittelte Dimerisierung der Pro-VWF-Untereinheiten statt (Sadler, 1998;Ulrichs et al., 2006).

Im Golgi-Apparat kommt es zur Multimeren-Bildung. Es folgen weitere posttranslationale Schritte wie eine Sulfatierung, die Fertigstellung der N- und O- Glykosylierung und die proteolytische Spaltung des VWF-Propeptids, welches die D1 und D2 Domäne enthält (Casari et al., 2013; Sadler, 2006; Titani et al., 1986).

### Die Struktur des VWF

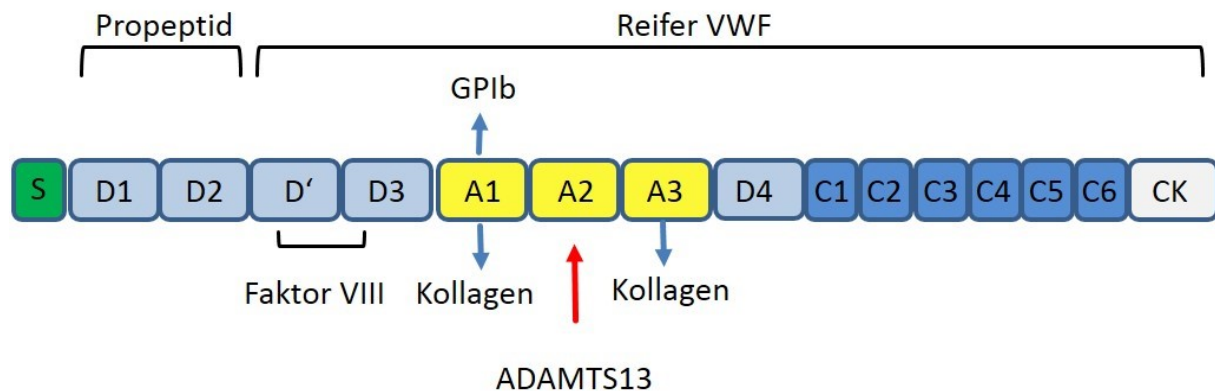


Abbildung 4: Domänenstruktur des Von-Willebrand-Faktors nach Zheng, 2015. Neben den Domänen sind verschiedene Bindestellen für Faktor VIII, Glykoprotein Ib, Kollagen und ADAMTS13 dargestellt.

Das reife VWF-Monomer besteht aus mehreren Domänen, welche vom N- zum C-Terminus wie folgt angeordnet sind: D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (Zheng, 2015; Zhou et al., 2012). In der A1 Domäne befindet sich die Bindestelle für GPIb $\alpha$ , welche für die Adhäsion der Thrombozyten wichtig ist; auch diese Domäne ist nur bei Entfaltung des VWF zugänglich (De Ceunynck et al., 2013). In der A1 Domäne befinden sich außerdem Bindestellen für Heparin, Sulfate und Kollagen (Borthakur et al., 2003; Mazzucato et al., 1999; Mohri et al., 1989; Morales et al., 2006). In der A2 Domäne befindet sich der Spaltbereich für ADAMTS13 zwischen den Aminosäuren Tyr1605 und Met1606 (Feys et al., 2009). In der ungebundenen, globulären Form ist die A2 Domäne für ADAMTS13 nicht zugänglich und der VWF ist vor Abbau durch ADAMTS13 geschützt (Crawley et al., 2009). Martin et al. zeigten 2007 in ihrer Arbeit, dass die A2 Domäne auch Einfluss auf die Bindungsaktivität der A1 Domäne und somit Einfluss auf die Bindung der Plättchen an den VWF hat (Martin et al., 2007).

Die A3 Domäne beinhaltet die Bindestelle für Kollagen I und III (Cruz et al., 1995; Kalafatis et al., 1987; Lankhof et al., 1996). Die A3 Domäne kann in der globulären Form an Kollagen in verletzten Gefäßen binden, wodurch es unter hohem Scherstress zur Entfaltung von VWF kommen kann (Crawley et al., 2009). Die C1 Domäne enthält die Arg-Gly-Asp Sequenz

(RGDS), welche unter anderem das Plättchenintegrin GPIIb/IIIa (auch Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  genannt) bindet (Andrews & Berndt, 2008).

### Ultralange VWF-Multimere

Ultralange VWF-Multimere, welche über Kopf an Kopf oder End zu End Verlängerungen von Multimeren entstehen können, können spontan GPIb, ein Oberflächenprotein der Thrombozyten, binden und stellen daher ein hohes Thromboserisiko in arteriellen Kapillaren dar (De Meyer et al., 2011; Furlan et al., 1997). In den großen VWF-Multimeren besitzen die Bindestellen für Kollagen und die Bindestellen für die Plättchen, GPIb und IIb/IIIa, eine sehr viel stärkere Affinität (De Meyer et al., 2009). Diese VWF-Stränge stehen im Verdacht Entzündungen zu begünstigen; in vitro konnte gezeigt werden, dass die Plättchen-behafteten VWF-Stränge Leukozyten verlangsamen (Bernardo et al., 2005).

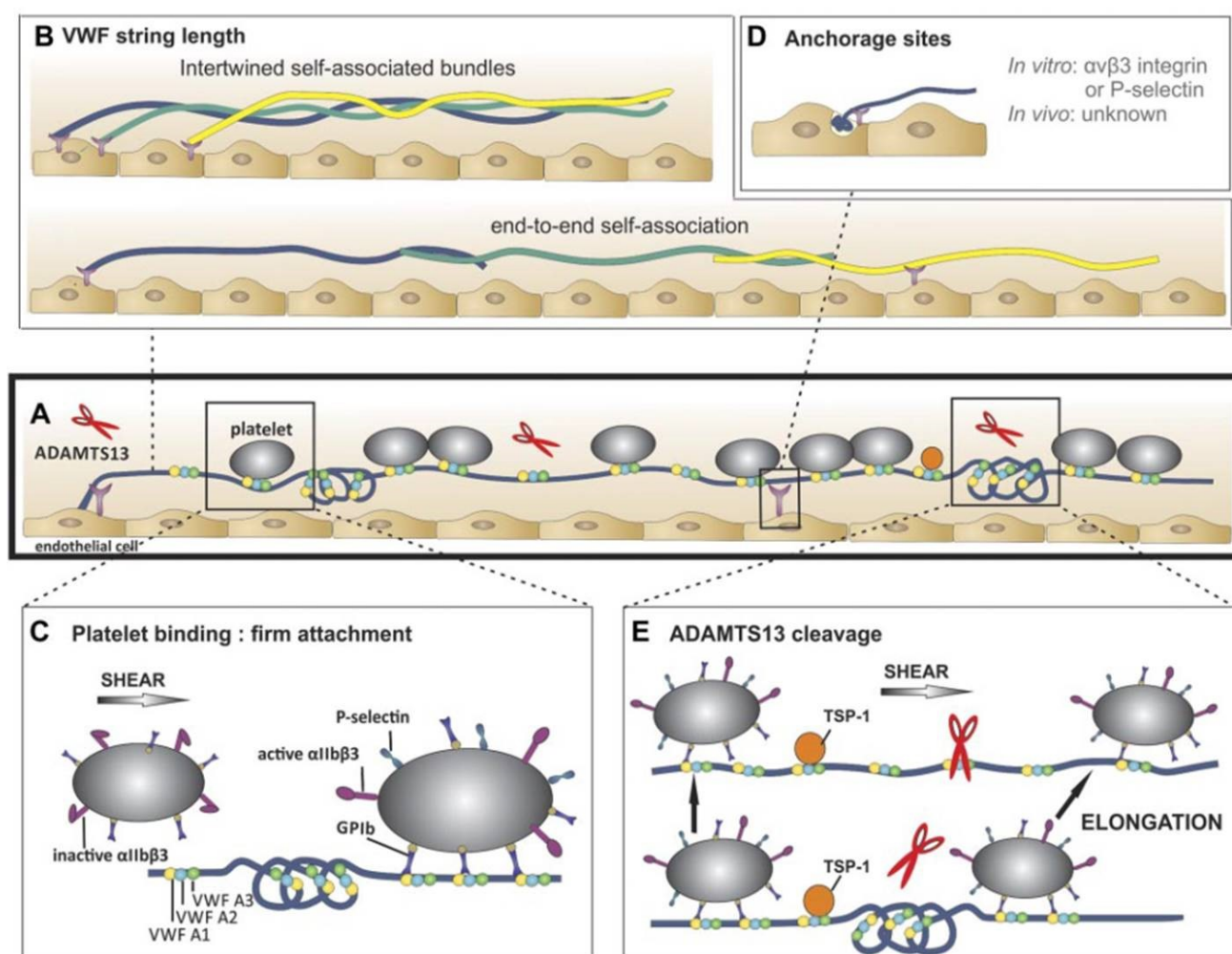


Abbildung 5: Die Rolle von VWF und ADAMTS13 in der Hämostase. Abbildung aus De Ceunynck, 2013.

In **Bild A** der Abbildung 5 ist ein VWF-Strang zu erkennen; die Domänen A1, A2 und A3 sind als gelbe, blaue und grüne Kreise dargestellt. Die violetten Y-förmigen Symbole stellen

Bindestellen dar. Plättchen sind als graue Kreise dargestellt und binden an die A1 Domäne. Die A2 Domäne ist für die ADAMTS13-Protease (rote Schere) im entfalteten VWF, wie wir ihn verankert und unter Scherkraft vorfinden, frei zugänglich und der VWF lässt sich spalten.

**Bild B** zeigt VWF-Stränge, wie man sie in vitro beobachtet. Man erkennt, dass VWF-Multimere oft aus vielen zusammenhängenden Strängen bestehen, welche sich entweder miteinander verflechten oder, wie man im unteren Bild sieht, sich jeweils an das Ende eines bereits gebundenen VWF-Strangs binden können.

In **Bild C** sieht man wie Thrombozyten mittels des GPIIb-Rezeptors an die A1 Domäne (gelber Kreis) binden.

Verankerte VWF-Stränge sind in **Bild D** dargestellt; Die VWF-Stränge werden von den Weibel-Palade-Körperchen ausgeschieden und verankern sich in vitro mittels P-Selectin oder  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin mit den Endothelzellen.

In **Bild E** ist die Spaltung des VWF durch ADAMTS13 abgebildet. Diese ist abhängig von konformellen Änderungen des VWF. Die A2 Domäne (blauer Kreis) liegt im entfalteten VWF offen zugänglich. Befindet sich der VWF im gefalteten Zustand oder interagiert TSP-1 (orangefarbener Kreis) mit den A2-A3 Domänen, kann ADAMTS13 den Ort der Spaltung in der A2 Domäne nicht erreichen.

#### Aufgaben als Trägerprotein

Neben der bereits beschriebenen Aufgabe als Mittler zwischen dem Kollagen des Subendothels und den Plättchen, was letztendlich zum Wundverschluss (primäre Hämostase) führt, hat der VWF außerdem noch eine wichtige Funktion als Träger und Stabilisator des Faktor VIII (Sadler, 1998). Die Bindestelle für Faktor VIII befindet sich in der D' und D3 Domäne. Faktor VIII ist ein Gerinnungsfaktor und Teil der lebenswichtigen Gerinnungskaskade. Er wirkt zusammen mit Calcium und Phospholipiden als Cofaktor für den Faktor IXa. Durch die Bindung an den VWF ist der Faktor VIII vor dem Abbau zeitweise geschützt. Ist Faktor VIII ungebunden, hat er eine Halbwertszeit von einer Stunde. In gebundener Form hat er eine Halbwertszeit von 8 bis 12 Stunden (De Meyer et al., 2009).

#### Abbau

Der bisher einzige gesicherte Abbau von VWF im Körper findet durch die Protease ADAMTS13 statt. In vitro konnte gezeigt werden, dass auch andere Proteasen, wie zum Beispiel Leukozyten-Proteasen, Cathepsin G und Elastase den VWF spalten und abbauen können (Raife et al., 2009). Casari et al. beschreiben in ihrer Publikation einen Zusammenhang zwischen der Sialylierung des VWF und dessen Abbau (Casari et al. 2013). Der von den Thrombozyten abgegebene hochmolekulare VWF ist durch eine veränderte Sialylierung resistenter

gegen den Abbau durch ADAMTS13 als der von den Endothelzellen sezernierte VWF (McGrath et al., 2013). Ist das Protein nicht sialyliert, besteht ein erhöhter Abbau im Körper. Rastegarlar et al. zeigten, dass das Protein LRP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein-1) maßgeblich zum Abbau des VWF beiträgt (Rastegarlar et al., 2012; Wohner et al., 2015). Als möglicherweise ebenso am Abbau beteiligt, beschreiben sie die Rezeptoren CLEC4M auf den Endothelzellen und Siglec-5 auf Makrophagen.

### 1.3 Die Protease ADAMTS13

#### Geschichte

ADAMTS13 wurde im Zuge der TTP-Forschung entdeckt. Upshaw berichtete 1978 von der Defizienz eines bisher undefinierten Faktors im Plasma einer TTP-Patientin, der scheinbar durch Gabe von Fremdplasma ausgeglichen werden konnte und die TTP und MAHA rückgängig machte (Upshaw, 1978). 1982 brachte Moake das Vorkommen von UL-VWF im Plasma von Patienten mit der Pathogenese der TTP in einen Zusammenhang (Moake et al., 1982). Wissenschaftler waren in der Folge auf der Suche nach einer VWF-spaltenden Protease. 1996 gelang der Gruppe um Furlan eine Teil-Aufreinigung der Protease (Furlan et al., 1996). Wie schon in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.1.2, Seite 3), wurde 2001 die Protease von mehreren Arbeitsgruppen identifiziert und als ADAMTS13 vorgestellt (Fujikawa et al., 2001; Gerritsen et al., 2001; Levy et al., 2001; Soejima et al., 2001; Zheng et al., 2001).

#### Eigenschaften

ADAMTS13 („a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13“) ist die 13. Protease der Familie der ADAMTS-Proteasen. ADAMTS-Proteasen übernehmen Aufgaben wie die Kollagen-Prozessierung, die Spaltung der Proteoglykane: Aggrecan, Versican und Brevican, die Hemmung der Angiogenese und die Spaltung des VWF. Außerdem scheinen die ADAMTS-Proteasen auch eine Rolle bei der Fruchtbarkeit, bei Entzündungen und bei der Organogenese zu spielen (Lancellotti et al., 2013). Das ADAMTS13-Gen umfasst 37 kb, es besteht aus 29 Exons und 1427 Aminosäuren und ist auf dem Chromosomsabschnitt 9q34 lokalisiert (Mansouri Taleghani et al., 2013; Zhou et al., 2005). ADAMTS13 ist eine 190 kDa große Zink-Metalloprotease. An der Endothelschicht gebundene UL-VWF-Multimere werden unter Scherstress von ADAMTS13 in kleinere Homodimere (176-140 kDa) umgewandelt (Dent et al., 1990; Tsai, 1996), welche im Plasma zu finden sind (Lancellotti et al., 2013). ADAMTS13 spaltet die Tyr1605-Met1606 Peptidbindung in der zentralen A2 Domäne des VWF Moleküls. In der Regel liegt die Konzentration von AD-

AMTS13 im Plasma des Menschen zwischen 0,1 und 0,5 µg/ml.

ADAMTS13 beeinflusst die biologische Aktivität des VWFs durch dessen Spaltung wesentlich. Umgekehrt beeinflusst aber auch der VWF den ADAMTS13. Neuere Forschungen zeigten, dass ADAMTS13 eine allosterische Aktivierung durch den VWF erfährt und dadurch in seiner katalytischen Aktivität verstärkt wird (Muia et al., 2014).

Eine reduzierte ADAMTS13-Aktivität wurde bei systemischen Entzündungen (Levy et al., 2001), beim Alterungsprozess (Mannucci et al., 2001), bei Sepsis (Nguyen et al., n.d.), Leberzirrhose, chronischer Urämie, idiopathischer Thrombozytopenie (ITP), disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC), systemischem Lupus Erythematosus (SLE), nach Operationen, bei Leukämie, bei Neugeborenen, während der Schwangerschaft und bei Einnahme von Kontrazeptiva beobachtet (Feys et al., 2009; Gandhi et al., 2012; Mannucci et al., 2001). Cao et al. fanden heraus, dass inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel der TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor), die Synthese von ADAMTS13 inhibieren, was auch die reduzierte ADAMTS13-Aktivität in den oben genannten Beispielen erklärt. Im Gegenzug dazu, scheint das antithrombotische Tretinoin (engl. ATRA) in der Lage diese Inhibition rückgängig zu machen und die Balance zwischen ADAMTS13 und VWF wiederherzustellen (Wang et al., 2015).

### Syntheseort

Die Protease ADAMTS13 wird hauptsächlich in den Ito-Zellen der Leber (auch hepatische Sternzellen genannt) exprimiert. Ito-Zellen sind Perizyten. In geringen Mengen wird ADAMTS13 außerdem in den Endothelzellen der Gefäße, Megakaryozyten und Plättchen, Gliazellen und Podozyten gebildet (Manea et al., 2007; Tauchi et al., 2012). Levy et al. zeigten in einem Northern Blot neben dem Vorkommen von 4,3 kb großen mRNAs in der Leber auch das Vorkommen von kürzeren ADAMTS13-mRNA Signalen in der Plazenta (Levy et al., 2001).

### Die Struktur der ADAMTS13-Protease

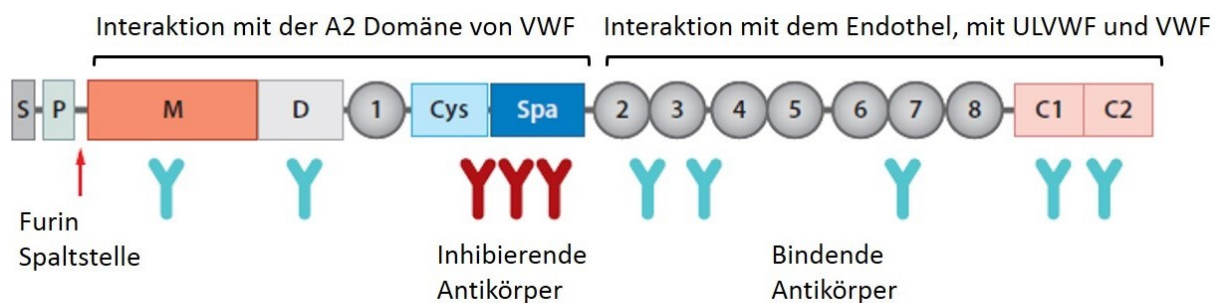


Abbildung 6: Domänenstruktur von ADAMTS13, modifiziert nach Zheng et al. 2015.

Die Struktur von ADAMTS13 ist in Abbildung 6 dargestellt. ADAMTS13 besteht aus mehreren funktionellen Domänen. Vom N- zum C-Terminus verläuft die Struktur wie folgt: Am N-Terminus befindet sich das Signalpeptid (**SP**), gefolgt von der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen-Metalloprotease (**M**), in welcher sich das katalytische Zentrum für die Spaltung von VWF befindet. Es folgt die Disintegrin-Domäne (**D**), ein Thrombospondin 1 (TSP1) repeat („1“), die cysteinreiche Domäne (**Cys**) und die Spacer-Domäne (**Spa**). Dieser Bereich interagiert mit der A2 Domäne des VWF. Distal von der Spacerregion findet man die TSP1 repeats 2 bis 8 (**2-8**) und die CUB-Domänen (**C1** und **C2**). Die TSP1 repeats 2 bis 8 interagieren mit dem VWF (Lancellotti et al., 2013).

Autoantikörper, wie man sie bei Patienten der sekundären/erworbenen TTP findet, binden hauptsächlich in der cysteinreichen Domäne und in der Spacer-Domäne. Diese Sequenz ist gut konserviert und wurde bei verschiedenen Spezies gefunden (Schimpanse, Hund, Ratte, Maus und Huhn). Der VWF scheint das einzige Substrat von ADAMTS13 zu sein (Chauhan et al., 2008).

### Murines ADAMTS13

In Mäusen wurden zwei Genvarianten von ADAMTS13 gefunden: eine dem Menschen ähnliche Form und eine zweite Form, die sich durch die Insertion von einem intrazisternalem A-Typ Partikel (IAP) und einem vorzeitigem Stopcodon unterscheidet (Banno et al., 2004). IAPs sind Retrotransposons, und besitzen die Fähigkeit zum eigenständigen Einbau im Genom. Diese zweite Form wurde in BALB/c, C3H/He, C57BL/6, und DBA/2 Mausstämmen gefunden, nicht aber im 129/Sv Mausstamm, mit welchem in unserer Arbeit gearbeitet wurde. Die Genvariante mit dem inserierten IAP, produziert ein Protein mit einer Länge von 1037 Aminosäuren, in der C-terminalen Region fehlen dadurch zwei weitere Thrombospondin-Motive und zwei CUB Domänen. Trotzdem konnten Banno et al. in vitro keine signifikante Veränderung in der Aktivität der Protease erkennen (Banno et al., 2004). Die verkürzte ADAMTS13-Protease scheint das Leben der Mäuse nicht zu beeinträchtigen. Im Menschen können Mutationen im Bereich der TSP1-repeats und den CUB- Domänen zu hereditärer TTP führen (Levy et al. 2001). Das Protein der IAP-freien Variante besteht aus nur einer Aminosäure weniger (1426 AS) als das Protein des Menschen. Es hat die gleiche Domänenstruktur. Der 129/Sv Stamm eignet sich daher besonders gut für die ADAMTS13-Forschung. Untersuchungen zeigten, dass isolierte IgG-Antikörper von TTP-Patienten ebenfalls an murines ADAMTS13 binden, was für die gute Vergleichbarkeit der humanen und murinen ADAMTS13-Protease spricht und die TTP-Forschung anhand von Mäusen legitimisiert.

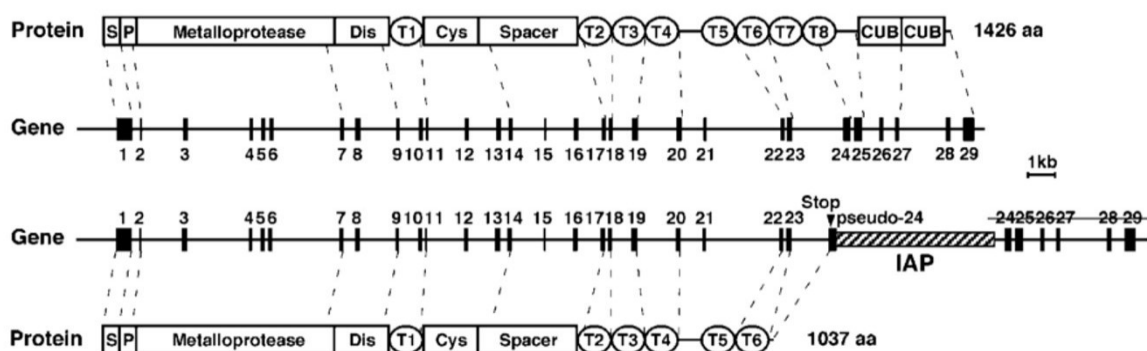
**mADAMTS13L (129/Sv and ICR)****mADAMTS13S (BALB/c, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, and ICR)**

Abbildung 7: Isoformen des ADAMTS13-Gens in Mäusen. Während mADAMTS13L dem menschlichen ADAMTS13 stark ähnelt, ist mADAMTS13S durch die Insertion eines IAP verkürzt. Beide Varianten transkribieren für eine funktionsfähige ADAMTS13-Protease. Abbildung entnommen aus Banno et al., 2004.

**1.3.1 Autoantikörper gegen ADAMTS13**

Autoantikörper gegen ADAMTS13 findet man sowohl bei der idiopathischen als auch bei der sekundären TTP. Es gibt neutralisierende und nicht neutralisierende Antikörper. Bei den neutralisierenden wird die Aktivität der ADAMTS13 Protease vermindert oder ganz gehemmt. In einer Studie mit 100 TTP-Patienten wurde bei 48% eine schwere ADAMTS13-Defizienz diagnostiziert. In dieser Gruppe wiederum fand man bei 87% der Patienten neutralisierende Antikörper (Peyvandi et al., 2004), was zeigt, dass Antikörper in der Regel für eine schwere ADAMTS13-Defizienz verantwortlich sind.

Die Bindung der bei der TTP gefundenen Antikörper erfolgt häufig an der cysteinreichen Spacerregion der ADAMTS13 (Hellmann et al., 2010). Zusätzlich wurden Antikörper gefunden, welche sich aufgrund unterschiedlicher Epitopenspezifität zum Beispiel gegen die CUB-Region, die Domänen der Metalloprotease und des Disintegrins, die TSP1 Repeats 2-8 Domäne, das Propeptid oder gegen CD36 richteten (Klaus et al., 2004; Schultz et al., 1998).

Meist handelt es sich bei den Antikörpern der idiopathischen TTP um IgG-Antikörper (Mai Falk & Scharrer, 2016; Peyvandi et al., 2004 ). Am häufigsten findet man die IgG4-Antikörper gefolgt von IgG1- und IgG2-Antikörpern (Dong et al., 2008; Ferrari et al., 2009). Auch IgM- und IgA-Antikörper wurden gegen ADAMTS13 beschrieben (Bettoni et al., 2012; Mai Falk & Scharrer, 2016; Scheiflinger et al., 2003).

Scheiflinger berichtet über das Vorkommen von nicht neutralisierenden ADAMTS13 IgG- und IgM- Antikörpern, welche die Aktivität der Protease nicht direkt störten. Möglich ist, dass hierbei die Halbwertszeit und der schnellere Abbau der Protease beeinflusst wird oder

dass diese Antikörper Interaktionen zwischen ADAMTS13 und weiteren Proteinen beeinflussen und letztlich zu einer Hemmung führen (Scheiflinger et al., 2003).

Bei der erworbenen TTP findet man bei den meisten Patienten ADAMTS13-spezifische Immunkomplexe. Diese enthalten vor allem IgG4-Antikörper (Plaimauer et al., 2015). Interessanterweise wurden diese Komplexe bei 93% der Patienten während der Remission auch Jahre später gefunden. Plaimauer et al. halten es für möglich, dass das mit follikulären dendritischen Zellen zusammenhängt, welche die Immunkomplexe an ihre Oberfläche binden und ein Antigen Depot für die Stimulation der Gedächtnis B-Zellen so über Jahre aufrecht erhalten (Plaimauer et al., 2015).

## 1.4 Die Rolle von ADAMTS13 und VWF in der Hämostase

### Die primäre Hämostase und der VWF

Der VWF spielt hauptsächlich in der primären Hämostase eine Rolle. Bei einer Verletzung der Endothelschicht im Blutgefäß werden das darunterliegende Subendothel und Kollagen frei zugänglich für Plasmaproteine. Zwar können die Plättchen mittels Integrin  $\alpha 2\beta 1$  und GPVI direkt an Kollagen binden, unter hoher Scherkraft benötigen die Plättchen jedoch den VWF als Mittler (Nuytens et al., 2011). Der VWF, welcher in den WPK und im Blut vorliegt, bindet an das freiliegende Kollagen im Subendothel. Die wichtigste Funktion des VWF besteht in seiner Rolle als Mittler für die Bindung zwischen dem freiliegenden Kollagen eines verletzten Gefäßes und den vorbeiströmenden Plättchen (Nuytens et al., 2011). Unter Scherkraft entfaltet sich der an das Kollagen gebundene VWF und legt seine Bindestellen für die Plättchen frei. Weitere im Plasma vorkommende VWF-Multimere binden an bereits gebundenen VWF, was die Fläche des VWF vergrößert (Ulrichs et al., 2005). Mit Hilfe des VWF, der die zirkulierenden Plättchen „einfängt“, ist ein schneller Verschluss des verletzten Gefäßes möglich (Zheng, 2015). Die Plättchen binden mit GPIb mittels des GPIb-V-IX Rezeptor Komplexes an die A1 Domäne des VWF. Die Bindung der Plättchen an den VWF wird Adhäsion genannt (Martin et al., 2007). Während der Adhäsion werden die Plättchen aktiviert und setzen unter anderem ADP und Thromboxan  $A_2$  frei, wodurch weitere Plättchen aktiviert werden. Die GPIb Bindungen zwischen Plättchen und VWF sind nur begrenzt stabil; löst sich die Bindung, rollen die Plättchen weiter über den VWF und das beschädigte Endothel. Die Bindung der Plättchen an Kollagen hingegen ist stabil (De Ceunynck et al., 2013; Gawaz, 1999). Mit den Kollagen-Rezeptoren GPIa/IIa, GPVI, GP IV und p65 gehen die Thrombozyten irreversible Bindungen ein (Wu et al., 2002). Es kommt letztendlich zur Spreizung und Aggregation der Plättchen, was zur Bildung eines ersten Pfropfs führt. Aktivierte Plättchen können

ebenfalls VWF aus den  $\alpha$ -Granula sezernieren, wodurch der hämostatische Effekt verstärkt wird (Crawley & Scully, 2013).

Ist die Aktivität der ADAMTS13-Protease, die den VWF spaltet, vermindert oder nicht vorhanden, kommt es gehäuft zu Ansammlungen von UL-VWF-Multimeren. An diesen UL-VWF-Multimeren bleiben Thrombozyten vermehrt hängen, was schließlich zur verstärkten Aktivierung und Aggregation der Plättchen und den TTP-typischen Mikrothrombosen führt.

## 1.5 Auslösen der TTP durch Trigger

Bei der erworbenen und der angeborenen TTP wurden wiederholt Trigger beobachtet, welche eine TTP direkt oder indirekt auslösen. So unterschiedlich wie sich die Symptome in den Patienten präsentieren, so unterschiedlich sind auch die Trigger. Die Wirkmechanismen hinter diesen diversen Triggern sind nur teilweise bekannt. Betrachtet man das Spektrum der Stoffklassen der verschiedenen Trigger, so liegt es nahe, dass es sich hierbei um unterschiedliche Mechanismen handeln muss, die den TTP-Schub herbeiführen. Zusätzlich ist bekannt, dass nicht alle als Trigger bekannte Substanzen in allen Patienten einen TTP-Schub auslösen; bei einigen Individuen zeigen sie keinerlei Auswirkung. Dieser Umstand gestaltet die Charakterisierung der Trigger und der für die Schübe verantwortlichen Mechanismen als schwierig. Die Untersuchung der Trigger in dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit der Trigger von der ADAMTS13-Defizienz sowie mögliche Ähnlichkeiten in den Mechanismen der Trigger erörtern und aufdecken. In Tabelle 1, Seite 26, werden die für diese Arbeit getesteten Trigger und die dazugehörigen Publikationen aufgeführt. Wir testeten verschiedene Trigger an ADAMTS13KO-Mäusen. Der Plättchenverbrauch, als erstes und auffälligstes Merkmal der TTP, wurde in den Versuchen dabei als wichtigster Indikator eines möglichen TTP-Schubs gewertet. Im Folgenden werden die an den Tieren getesteten Substanzen vorgestellt.

### 1.5.1 Rekombinanter Von-Willebrand-Faktor

Die ADAMTS13-defizienten Mäuse, die in dieser Arbeit untersucht wurden, erlitten über einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren keine spontanen TTP-Schübe. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass eine bloße Defizienz von ADAMTS13 in den Mäusen des 129S2/SvPasCrl Stamms keine Schäden hervorruft und eine höhere Konzentration von UL-VWF im Blut möglicherweise nicht den gleichen prothrombotischen Status in ihnen bewirkt wie das bei Menschen der Fall ist. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit rVWF sollte unser Mausmodell dem Menschen ähnlicher machen und, in Kombination mit bekannten Triggern der TTP, Triggereffekte verstärken.

Katharina Ebner (Ebner, 2015) zeigte, dass nach intravenöser Injektion mit rekombinantem humanen VWF (hier mit rhVWF abgekürzt) bei Mäusen des 129S2/SvPasCrl Stamms, die ADAMTS13KO-Mäuse mit einem höheren Plättchenverbrauch reagieren als die Wildtyp-Mäuse.

Für diese Arbeit sollte zunächst die geeignete Konzentration an rhVWF austitriert werden. Ziel war es eine Schwellendosis zu ermitteln, ab welcher ein Plättchenverbrauch bei den ADAMTS13KO-Mäusen, nicht aber bei den Wildtyp-Mäusen, herbeigeführt wird. Die Schwellendosis sollte dann mit weiteren Triggern der TTP verwendet werden, um ein TTP-ähnliches Krankheitsbild auszulösen.

### Pharmakologische Eigenschaften des rekombinanten VWF

Der für die Arbeit verwendete rekombinante VWF wurde von Baxter Innovations GmbH (jetzt Takeda, Stand 2019) hergestellt. Hierzu wurde eine CHO-Zelllinie so modifiziert, dass sie VWF und Faktor VIII exprimiert. In einem weiteren Schritt wurde der Faktor VIII vom VWF getrennt und zusätzlich eine furinvermittelte Reifung des VWF durchgeführt. Das rVWF-Konzentrat von Baxter enthält die hochmolekulare Form des VWF sowie ultralange VWF-Multimere, welche man in plasmatischen VWF-Präparaten nicht mehr findet (Turecek et al., 2009).

Der rekombinante VWF wurde uns für diese Arbeit von der ehemaligen Firma Baxter Innovations GmbH aus Österreich zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Phase 3 Studie wurden 2015 veröffentlicht und bestätigten den therapeutischen Nutzen von rhVWF bei Anwendung in VWS-Patienten (Gill et al., 2015).

### **1.5.2 Wilfactin**

Um den Einfluss der Größe der VWF-Multimeren in ADAMTS13KO-Mäusen zu untersuchen, sollte eine Behandlung mit plasmatischem VWF durchgeführt werden.

Bei Wilfactin, was auf dem deutschen Markt unter dem Namen Willfact bekannt ist, handelt es sich um plasmatisches humanes VWF-Konzentrat mit einem sehr geringen Gehalt an Faktor VIII. Es wird zur Prophylaxe und Therapie von Blutungen bei Patienten mit Von-Willebrand-Syndrom angewendet. Der fast nicht vorhandene FVIII in diesem Präparat, soll eine extreme Erhöhung des Faktor VIII-Spiegels im Plasma bei gleichzeitiger Gabe von VWF unterbinden. Im Gegensatz zu rhVWF von Baxter Innovations GmbH (Takeda) sind in Wilfactin unterschiedliche Größen an VWF-Multimeren enthalten, es besitzt im Vergleich zu rekombinantem VWF weniger UL-VWF-Multimere. Die pharmakologischen Eigenschaften entsprechen überwiegend denen von rhVWF.

### 1.5.3 Kogenate®

Kogenate® ist ein rekombinantes Faktor VIII Präparat, welches von BHK-Zellen („Baby Hamster-Kidney-Zellen“) produziert und dann durch verschiedene Schritte aufgereinigt wird. Es besteht aus einer 40 Da und einer 80 kDa Einheit. Kogenate® funktioniert wie der natürliche FVIII und normalisiert die aPTT. Es wird zur Therapie und Prophylaxe von Blutungen bei Hämophilie A Patienten verwendet („Fachinformation: KOGENATE®, 2017)

Mit der Gabe von Kogenate® sollte der Einfluss von Faktor VIII auf ADAMTS13KO-Mäuse und indirekt auf die TTP untersucht werden.

#### Eigenschaften und Funktion

Das Glykoprotein Faktor VIII ist ein wichtiger Blutgerinnungsfaktor der Gerinnungskaskade. Es ist etwa 300 kDa groß und ist aus den Domänen A1-A2-B-A3-C1-C2 aufgebaut. Aktivierter Faktor VIII ist Kofaktor für Faktor IX und unterstützt diesen bei der Aktivierung des Faktor X (Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016). Über weitere Schritte der Gerinnungskaskade führt dies zur Bildung von Fibrin und letztendlich zu einer erfolgreichen Blutgerinnung. Die Bindung an den VWF schützt den Faktor VIII vor dem Abbau.

### 1.5.4 Histone

Da Infektionen bekanntlich TTP-Schübe in Patienten auslösen können (Booth et al., 2012; George et al., 2010) und Histone mehrfach mit Infektionen assoziiert wurden (Allam et al., 2014; Beaulieu & Freedman, 2011), sollten Versuche mit diesen durchgeführt werden. Aus einer Arbeit von Fuchs et al. ist zusätzlich bekannt, dass extrazelluläre Histone Thrombozyten aktivieren und einen Einfluss auf die TTP haben (Fuchs et al., 2011). Fuchs beschreibt eine Gabe von 50 mg/kg Histone als höchste nicht letale Dosis bei Mäusen. Bei seiner Arbeit führte diese Dosis im Versuch zu einem Verbrauch der Thrombozyten von 90%.

#### Eigenschaften und Funktion

Histone sind alkalische Proteine, welche in der Regel intrazellulär im Zellkern von Eukaryoten zu finden sind.

Ihre Hauptfunktion besteht in der Wicklung der etwa einen Meter langen DNA im Zellkern. Es gibt 2 Klassen von Histonen: die Kernhistone und die Verbindungshistone. Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 sind Kernhistone, sie wickeln die DNA und bilden so Nukleosomen, die wiederum Teil des Chromatins sind (Allam et al., 2014; Fuchs et al., 2011). Histon H1, ein Verbindungshiston, erlaubt die Formierung der einzelnen Nukleosome zu Chromatin. Da sich die DNA in gewickeltem Zustand nicht transkribieren lässt, spielen die Histone zusätzlich eine Rolle in der Genregulation (Venkatesh & Workman, 2015). Gelangen Nukleosomen

in den extrazellulären Raum, etwa durch Zelltod, wirken sie toxisch für das umliegende Gewebe (Ammollo et al., 2011).

Histone sind auch als „Neutrophil extracellular traps“ (NETs) Teil der immunologischen Abwehr des Körpers (Brinkmann et al., 2004). NETs bestehen aus DNA-Fasern, Granula sowie Histonen und binden Pathogene, wodurch diese inaktiviert werden. Die Bildung von NETs ist auch für die körpereigenen Zellen toxisch und kann schädliche Nebenwirkungen hervorrufen (Fuchs et al., 2010, 2011).

### **1.5.5 Lipopolysaccharide**

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteil der äußeren Membran vieler gramnegativer Bakterien. Das Endotoxin LPS löst bei Säugetieren immunologische Reaktionen aus (Wang & Quinn, 2010). LPS wird vom Toll-like-Receptor 4 (TLR4) erkannt, welcher beispielsweise bei Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen zu finden ist. TLRs sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems; sie sind wichtig für die Erkennung von Pathogenen. Treffen Zellen des Immunsystems auf LPS, ist dies ein Signal für den Körper, dass eine Infektion stattgefunden hat, was eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Folge hat. Infektionen sind, wie oben erwähnt und wie durch zahlreiche Publikationen belegt, häufig Auslöser für eine TTP (Coppo et al., 2003; Crawley & Scully 2013; Gurevitz & Zorinsky 2011; Levy et al., 2005; Routy et al., 1991).

#### Eigenschaften

LPS besteht aus einer lipophoben O-Antigen Region (Oligosaccharidketten), einer R-Kern-Oligosaccharid Region und einer lipophilen A-Lipid Region (Zhao et al., 2002). Die A-Lipid Region ist die für den Körper toxische Komponente und besteht aus einem phosphoryliertem Diglucosamin mit Acylketten. Die innere Kernregion ist aus 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (Kdo) und L-Glycero-D-Manno-Heptose (Hep), und die äußere Region aus Hexose- und Hexosamin-Zucker zusammengestellt (Clifton et al., 2013).

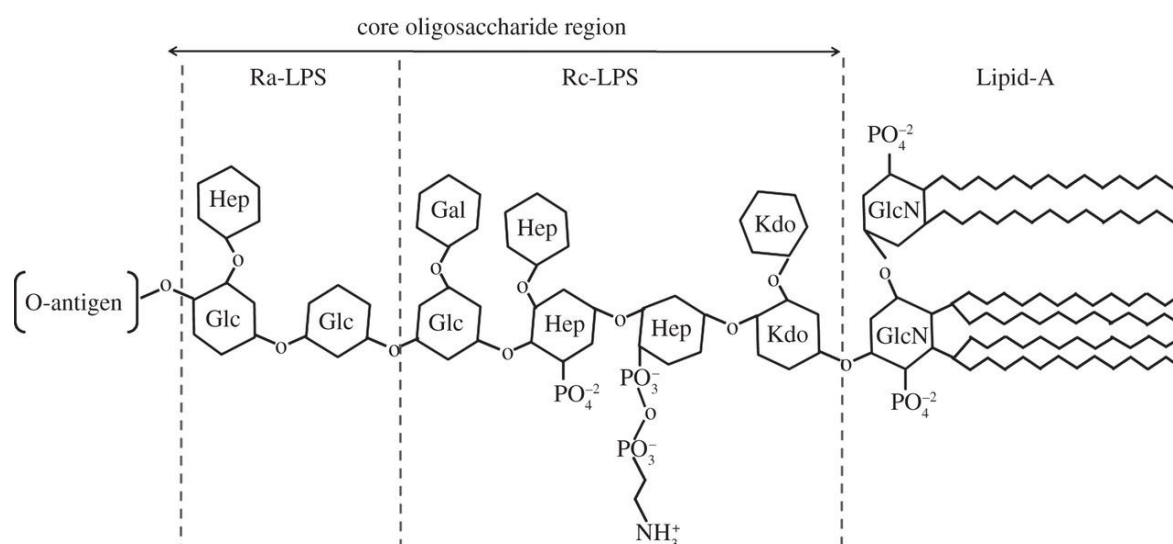


Abbildung 8: Struktur eines Lipopolysaccharids, entnommen aus Clifton et al. 2013.

### 1.5.6 Quensyl®

Quensyl® ist ein Medikament, welches u.a. zur Behandlung von Malaria verwendet wird. Der darin enthaltene Wirkstoff ist das chininverwandte Hydroxychloroquin (HCQ). Die chemische Summenformel lautet  $C_{18}H_{26}ClN_3O$ .

HCQ gehört, wie Chinin, zu der Gruppe der Chinoline. Chinin wurde in der Vergangenheit häufig als Trigger eines HUS-TTP-Schubs beschrieben (Baliga & Wingo, 2003; Gottschall et al., 1991; Kojouri et al., 2001; Medina et al., 2001). In manchen Fällen wird auch von einer Chinin-induzierten TMA gesprochen (Crum & Gable 2000; Reese et al. 2015). Eine Verknüpfung von TTP und Chinin findet man hauptsächlich in der älteren Literatur. Die neuere Literatur spricht zunehmend von einem HUS oder einer TMA, die durch Chinin ausgelöst wird. Es ist daher teilweise umstritten, ob Chinin eine TTP oder viel eher eine TMA oder ein HUS auslöst. In der Arbeit von Ebner konnte bei ADAMTS13KO-Mäusen keine Triggerwirkung durch Chinin nachgewiesen werden (Ebner, 2015), daher untersuchten wir die Wirkung von HCQ als chininverwandte Substanz. Beim Menschen sind Fälle von HCQ-induzierter TTP bekannt (Fromm, 2017; Letchumanan et al., 2009; Mar & Mendoza Ladd, 2011).

#### Pharmakologische Eigenschaften

HCQ hat im Gegensatz zu Chinin keine zytotoxische Wirkung (Korthagen et al., 2015). Das schwach basische und lipophile HCQ tritt leicht in Zellen über.

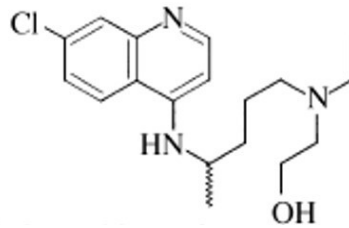


Abbildung 9: Strukturformel von Hydroxychloroquin, entnommen aus Warhurst (Warhurst et al., 2003)

HCQ wird auch gegen rheumatoide Arthritis und systemischen Lupus erythematodes (SLE) angewandt (Mutschler et al., 2012). Die antirheumatische Wirkung hängt wahrscheinlich mit einer immunsuppressiven Wirkung durch Hemmung des Komplements und der Antigen-Antikörper Reaktion zusammen (Fachinformation Quensyl<sup>®</sup>, 2018). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem Wirkmechanismus von HCQ um eine Stabilisierung der Lysosomenmembran und um eine Hemmung von lysosomalen Enzymen in Antigen-präsentierenden Zellen handelt. Dies führt zu einer Störung der proteolytischen Prozessierung von Antigenen (Graefe, 2016; Mutschler et al., 2012). Nach oraler Aufnahme wird HCQ beinahe vollständig resorbiert und findet sich u.a. im Vollblut. Es sammelt sich außerdem in größeren Mengen in Blutzellen und Organen an (Fachinformation Quensyl<sup>®</sup>, 2018). Es entstehen hauptsächlich zwei Metabolite, eines davon ist Desethylhydroxychloroquin (Fachinformation Quensyl<sup>®</sup>, 2018). Nebenwirkungen können Gewichtsverlust, Verwirrheitszustände, Neuropathien, Sehstörungen und gastrointestinale Störungen sein. HCQ ist laut Mutschler kontraindiziert bei Erkrankungen des blutbildenden Systems (Mutschler et al., 2012).

### 1.5.7 Ticlopidin

Ticlopidin ist ein bekannter Trigger der TTP. Die Wahrscheinlichkeit bei Behandlung mit Ticlopidin eine TTP zu entwickeln, beträgt etwa 1 zu 5000 (Zakarija et al., 2009). Bei Patienten mit Koronarstents liegt die Wahrscheinlichkeit deutlich höher (1 in 1600) (Jacob et al., 2012). Die TTP kann zwischen 2 bis 15 Wochen nach Behandlung mit Ticlopidin auftreten (Jacob et al., 2012; Marder et al., 2013). Bei der Medikamenten-assoziierten TTP wird Ticlopidin in einer Liste des FDA (U.S. Food and Drug Administration) als fünfthäufigster Auslöser erwähnt (Stand 1998-2011). In der Ticlopidin-assoziierten TTP kann oft eine schwere ADAMTS13-Defizienz festgestellt werden (Jacob et al., 2012). Auch in der Fachinfo ist TTP als Nebenwirkung erwähnt.

### Pharmakologische Eigenschaften

Ticlopidin gehört zu der Stoffklasse der Thienopyridin-Derivate und ist ein Thrombozytenaggregationshemmer. Früher wurde Ticlopidin unter anderem zur Prophylaxe gegen thrombotischen Gefäßverschluss und bei Patienten mit Stents eingesetzt (Bennett et al., 1998). Die Substanz wird als Prodrug verabreicht. Wie andere Thienopyridine wird Ticlopidin erst über CYP3A4 aktiviert und bindet irreversibel an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor. P2Y<sub>12</sub> ist ein Oberflächenprotein auf Thrombozyten und reguliert die Thrombozytenaggregation über ADP (Herbert & Savi, 2003). Durch die irreversible Blockierung des Rezeptors wird die Aktivierung der Thrombozyten verhindert (Algra & van Gijn, 2000). Ticlopidin durchläuft den Körper in einem enterohepatischen Kreislauf (Fachinformation Ticlopidin, 2016). Die Metabolisierung findet zum größten Teil in der Leber statt.

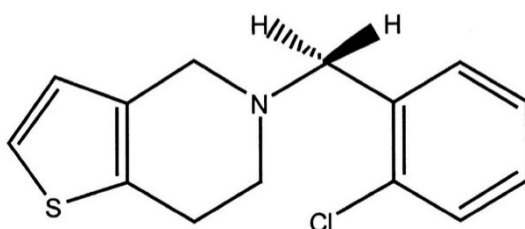


Abbildung 10: Strukturformel von Ticlopidin. Übernommen aus „Ticlopidine and Clopidogrel“ Quinn und Fitzgerald, 1999 (Quinn & Fitzgerald, 1999).

Bei oraler Gabe von Ticlopidin tritt eine dosis- und zeitabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Freisetzung von Plättchenfaktoren sowie eine Verlängerung der Blutungszeit ein (Fachinformation Ticlopidin, 2016). Als Nebenwirkungen wurden Magen-Darm-Störungen, Urtikaria, TTP, Leberschädigungen (Mutschler et al., 2012) und schwere hämatologische und hämorrhagische Störungen, wie Panzytopenie und Agranulozytose, beobachtet (Chen et al., 1999; Fachinformation Ticlopidin, 2016). Ticlopidin kann auch zu Cholestase führen (Tsai et al. 2000).

Die gefährlichste Nebenwirkung von Ticlopidin ist laut Mutschler die TTP. Seit der Einführung des Medikaments 1989, wurden zahlreiche Fälle von Ticlopidin-assoziiierter TTP beschrieben (Bennett et al., 1998; Chen et al., 1999; Gent et al., 1989; Jacob et al., 2012; Page et al., 1991; Zakarija et al., 2009).

#### **1.5.8 Gemcitabin**

Gemcitabin ist ein Difluor-Cytarabin und fungiert als Pyrimidin Antimetabolit. Als Zytostatikum wird es erfolgreich alleine oder in Verbindung mit anderen Zytostatika angewandt (Richmond et al., 2013). Es wird unter anderem bei Behandlung gegen Blasenkarzinome,

nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Pankreaskarzinom, Eierstockkrebs und maligne Lymphome verabreicht (Fachinformation Gemcitabin, 2015; Richmond et al., 2013). Gemcitabin greift die Tumorzellen direkt an und führt zur Apoptose (Komar-Stossel et al., 2014). Häufige Nebenwirkungen sind Anämien, Dyspnoe, Leuko- und Thrombopenien, Übelkeit (Mutschler et al., 2012) sowie erhöhte Transaminasen (AST und ALT), alkalische Phosphatasen, Proteinurie und Hämaturie (Fachinformation Gemcitabin, 2015).

In der Literatur findet man zahlreiche Fälle von Gemcitabin-induzierter TMA und Gemcitabin-induzierter TTP (Izzedine et al., 2006). Bei einer Gemcitabin-Behandlung steigt das Risiko eine TTP zu entwickeln drastisch, sobald eine kumulative Dosis von 20000 mg/m<sup>2</sup> erreicht ist (Zupancic et al., 2007). Bei der Gemcitabin-induzierten TTP geht man von einer Beschädigung der Endothelien durch Gemcitabin aus (Zupancic et al., 2007). Die Inzidenz der Gemcitabin-induzierten TTP liegt zwischen 0 bis 0,15% und 1 bis 4% (Zupancic et al., 2007).

### Pharmakologische Eigenschaften

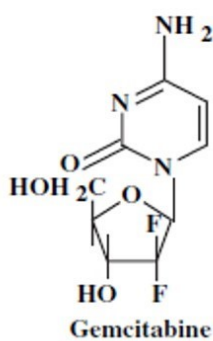


Abbildung 11: Strukturformel von Gemcitabin aus Mini et al. 2006.

Im Körper wird Gemcitabin (auch Difluordesoxycytidin, dFdC) zu einem Diphosphat (dFdCDP) und einem Triphosphat (dFdCTP) umgewandelt. dFdCDP hemmt die Ribonukleotidreduktase. Die Ribonukleotidreduktase katalysiert unter normalen Umständen die Reaktion, welche Desoxynukleosidtriphosphate für die DNA-Synthese liefert. Durch ihre Hemmung kommt es also zu einer allgemeinen Erniedrigung der Konzentration von Desoxynukleosiden, speziell von dCTP (Desoxycytidintriphosphat); hinzu kommt, dass dFdCTP mit dCTP um den Einbau in die DNA konkurriert (Selbst-Potenzierung).

Durch Einbau von Gemcitabin ergibt sich nach Einbau eines weiteren Nukleotids eine vollständige Hemmung und es kommt zu einem maskierten Kettenabbruch. In die DNA eingebaut, initiiert Gemcitabin eine Apoptose. Gemcitabin kann außerdem in die RNA eingebaut werden (Fachinformation Gemcitabin, 2015). Dadurch, dass Gemcitabin die Umwandlung von Cytidinphosphat in Desoxycytidinphosphat hemmt, verhindert es den Einbau von Desoxycytidinphosphat in die DNA (Mutschler et al., 2012). Gemcitabin greift daher hauptsächlich Zellen in der S-Phase (DNA-Synthese) an (Fachinformation Gemcitabin, 2015).

Gemcitabin wird von den Cytidineaminasen u.a. in der Leber, im Blut und der Leber metabolisiert woraufhin intrazellulär Mono-, Di- und Triphosphate des Gemcitabins entstehen. Die Ausscheidung von Gemcitabin erfolgt bei Menschen nach 5-11 Stunden beinahe vollständig (Fachinformation Gemcitabin, 2015).

### 1.5.9 Mitomycin C

Mitomycin C ist ein zytotoxisches Antibiotikum mit anti-neoplastischer Wirkung. Es wurde erstmals aus *Streptomyces caespitosus* isoliert (Fachinformation Mitomycin, 2016). Als Nebenwirkungen von Mitomycin werden unter anderem Myelosuppression und Schädigungen des Endothels genannt. Außerdem treten bei bis zu 10% der Patienten schwerwiegende toxische Organschäden in Niere und Lunge auf (Mutschler et al., 2012). Es gibt zahlreiche Berichte über Mitomycin-induziertes HUS und TTP (Cattell 1985; El-Ghazal et al. 2011; Kasper et al. 2007; Zakarija & Bennett 2005). In Biopsien wurden hierbei glomeruläre und mikrovaskuläre Nekrosen beobachtet. Eine Mitomycin-induzierte TTP/HUS tritt in der Regel 4 bis 9 Wochen nach der letzten Chemotherapie auf, kann jedoch auch in einem Zeitraum von 4 bis 15 Monaten später auftreten (El-Ghazal et al. 2011).

#### Pharmakologische Eigenschaften

Mitomycin wird erst bei physiologischem pH-Wert oder durch NADPH zu einem trifunktionellen Alkylans reduziert (Fachinformation Mitomycin, 2016). Nach Reduktion ist Mitomycin in der Lage Interstrang-Quervernetzungen mit der DNA zu bilden (Kumar et al., 1997). In der Struktur der Mitomycine finden sich Chinon-, Aziridin- und Carbamatgruppen wieder, welche eine große Zahl an unterschiedlichen Reaktionen zulassen (Paz et al., 2012).

Die Hauptwirkung von Mitomycin hängt mit der Alkylierung der DNS (selten RNS) und einer damit verbundenen Hemmung der DNS-Synthese zusammen. Proliferierende Zellen werden stärker geschädigt. Durch höhere Dosen werden Peroxidradikale freigesetzt, welche zu DNS-Brüchen führen. Die organspezifischen Nebenwirkungen werden mit der vermehrten Freisetzung von Peroxidradikalen in Verbindung gebracht.

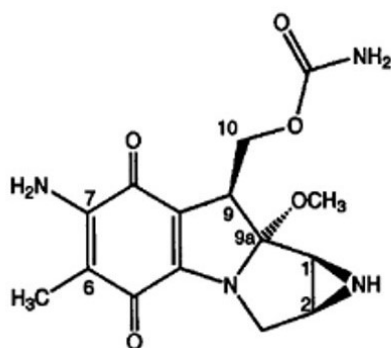


Abbildung 12: Strukturformel von Mitomycin C. Entnommen aus Verweiji, 1990 (Verweij & Pinedo, 1990)

Die Halbwertszeit beträgt zwischen 30 und 70 Minuten (Mutschler et al., 2012). Hauptort der Metabolisierung und der Elimination ist die Leber. Es wird zur Behandlung gegen Pankreas-,

Magen-, Blasen- und Ösophagus-Karzinom sowie bei chronisch-myeloischer Leukämie angewendet (Mutschler et al., 2012). Bei intravesikaler Therapie wird Mitomycin in nur unwesentlichen Dosen resorbiert, so dass in der Regel nicht mit systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Bei paravenöser Injektion oder beim Übertritt aus dem Gefäß in umliegendes Gewebe verursacht Mitomycin Nekrosen. Neben den typischen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika wie Knochenmarksuppression, Leukopenie, Thrombopenie, Übelkeit und Erbrechen, werden selten allergische Reaktionen, HUS und TMA gemeldet. Die TMA ist dosisabhängig und wurde ab Dosen von 30 mg Mitomycin/m<sup>2</sup> Körperoberfläche als Nebenwirkung gemeldet (Fachinformation Mitomycin, 2016).

## 1.6 Literaturübersicht: Trigger der TTP

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Trigger und eine Auswahl an Literatur in welcher die Trigger bereits in Verbindung mit TTP gebracht wurden.

Tabelle 1: Aufgeführt sind in der Arbeit getestete Trigger der TTP sowie die Anzahl von ausgewählten beschriebenen Fällen in der Literatur. TMA und HUS stehen in Klammern, insofern die Fälle als TMA oder HUS diagnostiziert wurden. (Abkürzung: na= nicht angegeben. TMA = Thrombotische Mikroangiopathie; HUS=Hämolytisch-urämisches Syndrom)

| Trigger                        | Anzahl beschriebener Fälle                                | Quelle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Antiplättchensubstanzen</b> |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>-Thienopyridine</b>         |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Ticlopidin</b>              | 22<br>97<br>1<br>1<br>1<br>13<br>40<br>60<br>4            | Bennett 2013 (Bennett et al., 2013)<br>FDA review bis 2011 (Jacob et al., 2012)<br>Matsuda 2006 (Matsuda et al., 2006)<br>Türken 2003 (Turken et al., 2003)<br>Naseer 2001 (Naseer et al., 2001)<br>Chen 1999 (Chen et al., 1999)<br>Bennett 1999 (Bennett et al., 1999)<br>Bennett 1998 (Bennett et al., 1998)<br>Page 1991 (Page et al., 1991) |
| <b>Chemotherapeutika</b>       |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Gemcitabin</b>              | 2 (TMA)<br>1<br>1<br>3 (TMA)<br>9 (TMA)<br>na<br>12 (HUS) | Richmond 2013 (Richmond et al., 2013)<br>Kasi 2011 (Kasi, 2011)<br>De Smet 2008 (De Smet et al., 2008)<br>Izzedine 2006 (Izzedine et al., 2006)<br>Humphreys 2004 (Humphreys et al., 2004)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Fung 1999 (Fung et al., 1999)                                                                      |
| <b>Mitomcyin</b>               | 11 (TMA)<br>1<br>1<br>1<br>1<br>1 (TMA)<br>na             | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Shah 2013 (Shah et al., 2013)<br>El-Ghazal 2011 (El-Ghazal et al., 2011)<br>Hong 2011 (Hong et al., 2011)<br>Ontilio 2009 (Ontilio et al., 2009)<br>Kasper 2007 (Kasper et al., 2007)<br>Erwähnt in Bukowski 1985 (Bukowski, 1985)                                                                            |

|                                                |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                | 52 (HUS)                                                                                                                                                   | Cantrell 1985 (Cantrell et al., 1985)                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Chinine</b>                                 |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Chinin</b>                                  | 63 (TMA)<br>1 (HUS-TTP)<br>17 (TTP-HUS)<br>1 (HUS)<br>1 (ITP)<br>3 HUS                                                                                     | Reese 2015, review (Oklahoma Registry 1989-2014) (Reese et al., 2015)<br>Baliga 2003 (Baliga & Wingo, 2003)<br>Kojouri 2001 (Kojouri et al., 2001)<br>Crum 2000 (Crum & Gable, 2000)<br>Glynne 1999 (Glynne et al., 1999)<br>Gottschall 1991 (Gottschall et al., 1991)<br>Und viele weitere Publikationen |
| <b>Hydroxychloroquin</b>                       | 1 (Thrombozytopenie)<br>1 (vermutet)<br>1 (Thrombozytopenie)                                                                                               | Demir 2014 (Demir et al., 2014)<br>Mar 2011 (Mar & Mendoza Ladd, 2011)<br>Vazquez 2016 (Vazquez et al., 2016)                                                                                                                                                                                             |
| <b>Infektionen als Trigger</b>                 |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Infektionen (viral, bakteriell, fungal)</b> | 1 (durch Dengue-Virus)<br>1 (durch Brucella)<br>1 (durch Brucella)<br>1 (durch Borrelia)<br>34 (verschiedene Infektionen)<br>31 (verschiedene Infektionen) | Deepanjali 2015 (Deepanjali et al., 2015)<br>Erdem 2007 (Erdem et al., 2007)<br>Kiki 2008 (Kiki et al., 2008)<br>Schroder 1995 (Schroder et al., 1995)<br>Marjolaine 2014 (Marjolaine et al., 2014)<br><br>Booth 2012 (Booth et al., 2012)<br>Und viele weitere Publikationen                             |

## 1.7 Biomarker der TTP

Bei Untersuchungen auf eine TTP werden häufig neben dem Plättchenverbrauch, der als auffälligstes Merkmal der TTP gilt, weitere Parameter, wie die LDH-Konzentration und das Vorliegen von Fragmentozyten überprüft. Insofern Komplikationen in den Nieren auftreten, werden zusätzlich das Kreatinin und der Harnstoff-Stickstoff gemessen. Aufgrund der Anämie in TTP-Patienten wird oft der Coombs-Test durchgeführt. Der Coombs-Test untersucht, ob Antikörper gegen Erythrozyten für die hämolytische Anämie verantwortlich sind. Typisch für die TTP ist ein negativer Coombs-Test. In unserem Versuch testeten wir die LDH-Konzentration. Die Troponin-Konzentration untersuchten wir als einen neueren Biomarker für die TTP, der unserer Erkenntnis nach bisher noch nicht in ADAMTS13KO-Mäusen als TTP-Biomarker untersucht wurde.

### Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym. In den extrazellulären Raum gelangt sie nur durch eine Schädigung der Zellmembran. Sie eignet sich daher sehr gut als Indikator für Zelltod im Blutplasma. LDH ist ein Parameter, welcher bei der TTP-Diagnose oft mituntersucht wird (Scully et al., 2012). Da bei der TTP typischerweise Erythrozyten zerstört werden, sollte der LDH-Wert in dieser Arbeit als zusätzliches Indiz für eine TTP dienen.

### Herzschäden bei der TTP: Messung über kardiales Troponin

Bei der TTP wurden von jeher auch kardiale Mikrothrombosen beobachtet (Amorosi & Ultmann, 1965; Hawkins et al., 2008; Ridolfi & Bell, 1981). Da Gandhi et al., wie auch andere Wissenschaftler, von einer höheren Sterberate bei TTP-Patienten mit Herzschäden berichteten (Gandhi et al., 2010), sollte in dieser Arbeit unser Tiermodell auf kardiale Schäden untersucht werden.

Ein wichtiger Marker von Herzschäden ist kardiales Troponin. Dieses befindet sich in den Aktin-Myofilamenten des Herzens und spielt eine wichtige Rolle bei der Calcium-abhängigen Regulierung der Herzmuskulatur (Korff et al., 2006). Troponin besteht aus 3 Untereinheiten, Troponin I (cTnI, cardiac Troponin I), Troponin T (cTnT) und Troponin C (cTnC). cTnI inhibiert die Aktin-Myosin Wechselwirkung, cTnT bindet Tropomyosin und nimmt eine regulatorische Rolle ein und cTnC bindet  $\text{Ca}^{2+}$  (Murphy, 2002; Van Eyk et al., 1997).

Die Untereinheiten cTnI und cTnT eignen sich besonders gut als spezifische und sehr sensible Biomarker, welche Schädigungen und Nekrosen in den Myozyten des Herzens sichtbar machen (Hughes et al., 2009; Thygesen et al., 2012 ).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Tiermodell

Zur Untersuchung der Triggermechanismen der TTP wurden speziell gezüchtete ADAMTS13 defiziente Mäuse, welche hier „ADAMTS13KO-Mäuse“ genannt werden, verwendet. Die Herstellung des Knockouts wurde am National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) von Toshiyuki Miyata in Japan durchgeführt. Die Mutation wurde auf Mäuse mit einem 129S6/SvEvTac-Hintergrund gezüchtet (Banno et al., 2006). Im ADAMTS13-Knockout-Stamm wurden die Exone 3-6, die für die katalytische Domäne des Proteins kodieren, durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Diese Deletions-Mutation führt zu einer nicht funktionsfähigen ADAMTS13-Protease. Die offizielle Bezeichnung des Allels lautet: *Adamts13<sup>tm1Myta</sup>* [a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 13; targeted mutation 1, Toshiyuki Miyata].

Als Kontrolltiere zu den jeweiligen Versuchen verwendeten wir Wildtyp-Mäuse der Linie 129S2/SvPasCrl aus dem Labor Charles River. Die Versuchstiere wurden in einem Tierstall nach den allgemein gültigen Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten und gezüchtet. Für die Tierversuche gelten die Paragraphen 7-9 (5. Abschnitt) des Tierschutzgesetzes (Stand 2010).

#### Berechtigung zu Tierversuchen

Die durchgeführten Tierversuche wurden unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Der Tierversuchsantrag läuft unter der Nummer G 11-1-024 und wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt.

#### Rückkreuzung

Da auffiel, dass die ADAMTS13KO-Mäuse in der Regel eine höhere Thrombozytenzahl aufwiesen und sich darüber hinaus phänotypisch von den 129S2/SvPasCrl-Wildtypen unterschieden, wurde eine Rückzucht gestartet. Trotz der nahen Verwandtschaft der Mausstämme ist es nicht auszuschließen, dass nach mehreren Generationen genetischen Veränderungen stattfanden. Durch die Rückzucht sollte gewährleistet werden, dass die Wildtyp- und die Knockout-Mäuse weitgehend genetisch vergleichbar sind. Die Rückkreuzung wurde im Laufe der Arbeit bis zur 7. Generation durchgeführt. Bei einer Rückkreuzung wird ein bestimmtes Merkmal, in diesem Fall die Deletions-Mutation im ADAMTS13-Gen, auf eine gewünschte Linie, hier auf 129S2/SvPasCrl, gezüchtet.

### Schema einer Rückkreuzung

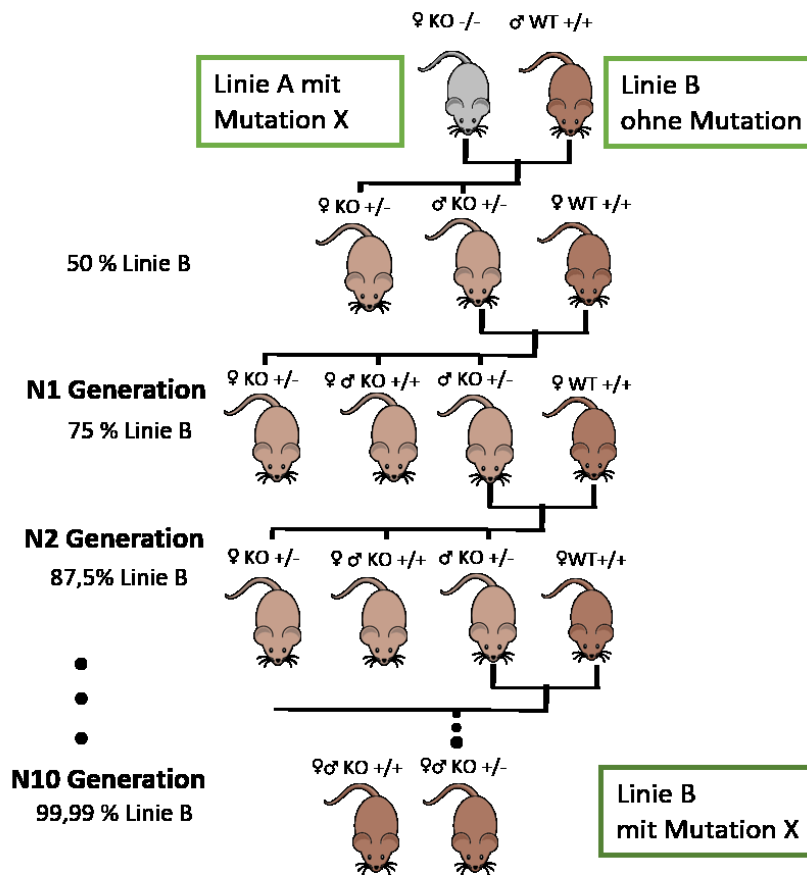


Abbildung 13: Schema der Rückkreuzung. Ziel der Rückkreuzung ist es ein bestimmtes genetisches Merkmal, hier als Mutation X gekennzeichnet, von einer Mauslinie (Mauslinie A) auf eine andere Mauslinie zu kreuzen (Mauslinie B). In der N10-Generation ist das Merkmal zu 99,99% auf Linie B übertragen.

In Abbildung 13 ist ein Schema der Rückkreuzung dargestellt. Hierzu wird zunächst das Weibchen mit der gewünschten Mutation mit einem Wildtyp-Männchen gekreuzt. Die Nachkommen sind alle heterozygot. Aus dem Wurf wird ein heterozygoter ♂ ausgewählt und mit einem fremden Wildtyp-Weibchen gekreuzt. Der Wurf dieses Pärchens stellt die N1-Generation dar. Aus der N1-Generation wird wieder ein heterozygoter ♂ abermals mit einem nicht verwandten Wildtyp-Weibchen gekreuzt. Es entsteht die N2-Generation, aus der wiederum ein heterozygoter ♂ mit einem Wildtyp-Weibchen gekreuzt wird. Um das gewünschte Merkmal mit Sicherheit vollständig auf den gewünschten Hintergrund zu züchten, kreuzt man die Mäuse auf diese Weise bis man die N10-Generation erreicht. Die gewünschte Mutation ist dann zu 99,99% auf die gewünschte Linie übertragen (zum Beispiel auf 129S2/SvPasCrl). Für unsere Versuche wurden bereits Tiere aus der N5-Generation verwendet. Die davon erhaltenen homozygoten ADAMTS13KO-Mäuse wurden für unsere Ver-

suche verwendet. Das Alter der Versuchsmäuse betrug in der Regel 8-16 Wochen. Es wurden männliche und weibliche Versuchstiere verwendet.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Geräte

In der folgenden Tabelle sind die für die Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 2:Geräte

| Geräte                                                                                       | Hersteller                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b><u>Blutanalyse</u></b>                                                                    |                                                        |
| Automatischer Hämatologie-Analysator: Sysmex KX-21N                                          | Sysmex Corporation (Kobe, Japan)                       |
| Scil vet ABC™ Hematology analyzer                                                            | Scil animal care company GmbH (Viernheim, Deutschland) |
| <b><u>Multimeranalyse</u></b>                                                                |                                                        |
| Blottingkammer: Trans-Blot® Cell, 49BR                                                       | BIO RAD-Laboratories (München, Deutschland)            |
| Blottinggerät: Power Pac™ HC                                                                 | BIO RAD-Laboratories (München, Deutschland)            |
| Elektrophoresekammer: LKD Bromma 2117 Multiphor                                              | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)                  |
| Elektrophoreseapparatur: Electrophoresis Power Supply–EPS 601                                | Amersham Biosciences (Amersham, UK)                    |
| <b><u>PCR</u></b>                                                                            |                                                        |
| Thermo Cycler: Mastercycler® pro S, vapo. protect, Eppendorf C1000™, CFX96™ Real-Time System | BIO RAD-Laboratories (München, Deutschland)            |
| <b><u>Sonstige Geräte</u></b>                                                                |                                                        |
| Mikrotiterplatten-Lesegerät (Photometer)                                                     | OpsysMR, DYNEX Technologies (Denkendorf, Deutschland)  |
| Feinwaage: CPA 1003P                                                                         | Sartorius (Göttingen, Deutschland)                     |
| Gel-Dokumentation: GelDoc™ EZ imager                                                         | Bio Rad Laboratories (München, Deutschland)            |
| Kreisschüttler: Lab dancer                                                                   | VWR International (Darmstadt, Deutschland)             |
| Kühlung: Umwälzthermostat, Model 1162A                                                       | VWR International (Darmstadt, Deutschland)             |
| Kühlschrank                                                                                  | VWR International (Darmstadt, Deutschland)             |
| Magnetrührer: neoMag-Standard-Magnetrührer, D-6011                                           | neoLab® (Heidelberg, Deutschland)                      |
| Mikroskopie: Olympus IX73                                                                    | Olympus (Shinjuku, Tokio, Japan)                       |

|                                                                                                                                                                                                      |                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| pH-Meter:<br>HI 2211 pH/ORP Meter                                                                                                                                                                    | Hanna Instruments Deutschland GmbH<br>(Vöhringen, Deutschland) |
| Pipetten:<br>Eppendorf Reference® Pipetten:<br>0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl<br>-Eppendorf Research® plus, (multichannel),<br>30-300µl<br>-Multipette® plus, Eppendorf | Eppendorf (Hamburg, Deutschland)                               |
| Rüttelplatte: ORBITAL SHAKER DOS-10L                                                                                                                                                                 | neoLab® (Heidelberg, Deutschland)                              |
| Tischzentrifuge                                                                                                                                                                                      | REMI Elektrotechnik Limited (Mumbai, Indien)                   |
| Tiefkühlschrank -86°                                                                                                                                                                                 | VWR International (Darmstadt, Deutschland)                     |
| Wasserbad: Julabo ED-5A                                                                                                                                                                              | Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland)                            |
| Zentrifuge:<br>Allegra X-30R Series Rotor F2402H                                                                                                                                                     | BECKMAN COULTER<br>(Brea, USA)                                 |

Tabelle 3: Software

| Software                           | Hersteller                                     |
|------------------------------------|------------------------------------------------|
| ELISA: DYNEX Revelation™ QuickLink | DYNEX Technologies (Denkendorf, Deutschland)   |
| GraphPad PRISM Version 6           | GraphPad Software, Inc,<br>(La Jolla, CA, USA) |

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien                                                  | Hersteller                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 10, 20, 200, 1000 µl Pipettenspitzen, steril, Rack mit und ohne Filter | StarLab (Hamburg, Deutschland)<br>und Ep T.I.P.S.® Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| 10, 20, 200, 1000 µl Pipettenspitzen, lose ohne Filter                 | StarLab (Hamburg, Deutschland)<br>und Eppendorf (Hamburg, Deutschland)              |
| Einmalspritzen: Injekt, 2 ml                                           | B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)                                      |
| Falcon® Gefäß 15 ml und 50 ml                                          | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)                                            |
| Latexhandschuhe, Größe M                                               | Lohmann & Rauscher (Neuwied, Deutschland)                                           |
| Microlance Kanüle 26G x 3/8 ; 0,45 x10 mm                              | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)                                            |
| Microlance Kanüle 30G x 1/2 ; 0,29 x13 mm                              | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)                                            |

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Micro-Haematokritröhren, Na-heparinized<br>DIN ISO 12772                                                                   | Assistent <sup>®</sup> , Hecht (Sondheim/Rhön,<br>Deutschland)                                                                                      |
| Microseal "B" Adhesive Seals                                                                                               | Bio-Rad Laboratories (München, Deutsch-<br>land)                                                                                                    |
| Microvette <sup>®</sup> CB 300 K2E Kalium-EDTA                                                                             | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)                                                                                                                   |
| Mikrotiterplatte, 96-well, Nunc <sup>®</sup><br>(Maxi Sorp und unbehandelt, transparent<br>und weiß, Flach- und Rundboden) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland)                                                                                                                |
| Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost<br>und 76 x 26 mm)                                                                 | Thermo Scientific, (Braunschweig, Deutsch-<br>land)                                                                                                 |
| Pasteurpipetten, unsteril                                                                                                  | VWR (Darmstadt, Deutschland)                                                                                                                        |
| PCR-Reaktionsgefäße, 8er-Strips                                                                                            | StarLab (Hamburg, Deutschland)<br>Axon Labortechnik (Kaiserslautern,<br>Deutschland)<br>Biozym Scientific GmbH<br>(Hessisch Oldendorf, Deutschland) |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml                                                                                     | Eppendorf (Hamburg, Deutschland)<br>Sarstedt AG& Co (Nümbrecht, Deutsch-<br>land)                                                                   |
| serologische Pipetten, 5, 10, 25, 50 ml                                                                                    | Greiner (Frickhausen, Deutschland)                                                                                                                  |

### 2.2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Medikamente

| <b>Chemikalie</b>                                   | <b>Firma</b>                                      |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Agarose SeaKem <sup>®</sup> HGT(P)                  | Lonza (Basel, Schweiz)                            |
| Agarose LGT Typ VII, 2-<br>Hydroxyethylagarose      | Sigma-Aldrich (München, Deutschland)              |
| Agarose StarPure (N3101-0500)                       | STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)               |
| Aqua B. Braun Spüllsg.                              | B. Braun Melsungen AG (Melsungen,<br>Deutschland) |
| Bovines Serumalbumin                                | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                |
| Calciumchlorid                                      | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                |
| Chromatography Papier 2 CHR/46x57cm<br>(0,18mm)     | Whatman (Maidstone, UK)                           |
| Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat<br>≥99.5%, p.a. | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                |
| DMSO                                                | Sigma-Aldrich (München, Deutschland)              |
| Essigsäure 100%                                     | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                |
| Ethanol                                             | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                |
| Forene <sup>®</sup> , 250 ml (Isofluran)            | na                                                |
| Filterpapier 35x45 model 583 Gel Dryer              | Bio-Rad Laboratories (München, Deutsch-<br>land)  |
| GelRed <sup>TM</sup> Nucleic Acid stain             | Biotrend Chemikalien GmbH                         |
| Gemcitabin Hydrochlorid                             | Sigma Aldrich (München, Deutschland)              |

|                                                        |                                                                   |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung                  | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                    |
| Glycin >99,9% CELLPURE®                                | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Histone (aus Kälber Thymus), Lyophilized               | CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (Troisdorf, Deutschland) |
| Ketamin –Hameln (50mg/ml)                              | Hameln Pharmaceuticals GmbH (Hameln, Deutschland)                 |
| Kogenate® 1000 IE<br>FS Bayer, INN: Octocog alfa       | Bayer (Leverkusen, Deutschland)                                   |
| Lipopolysaccharide von <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland)                              |
| Mitomycin C                                            | Medac Gesellschaft (Wedel, Deutschland)                           |
| May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung                 | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                    |
| Mercaptoethanol 99%, p.a.                              | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Methanol                                               | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Natriumchlorid >99,9% CELLPURE®                        | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Natriumdihydrogen-phosphat                             | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Natrium-Citrat                                         | EIFELFANGO GmbH & Co. KG (Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)    |
| Nitrocellulosemembran Trans-Blot® Transfer Medium      | BioRad-Laboratories (München, Deutschland)                        |
| Phosphatpuffer PBS ohne Calcium und Magnesium          | Invitrogen (Carlsbad/ California, USA)                            |
| Positivkontrolle des ACTIFLUOR™ ADAMTS13 activity kits | American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, Deutschland)               |
| Quensyl®                                               | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt, Deutschland)          |
| Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazin)                        | Bayer (Leverkusen, Deutschland)                                   |
| Roti®-Histofix 4%                                      | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Salzsäure                                              | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Schwefelsäure 95% P.A.                                 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| SDS                                                    | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Ticlopidin-neuraxpharm, 250 mg Filmtabletten           | Neuraxpharm Arzneimittel GmbH (Langenfeld, Deutschland)           |
| TRIS                                                   | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Tris HCl                                               | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Triton® X-100                                          | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Tween 20 Molecular biology grade                       | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| VWF (recombinant human VWF)                            | Baxter Bioscience (Wien, Österreich)                              |
| Wasserstoffperoxid 30%                                 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                |
| Wilfactin                                              | LFB (Les Ulis, Frankreich)                                        |

### 2.2.4 Antikörper und Primer

#### Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

| Antikörper                      | Spezifität | Monoklonal/<br>Polyklonal<br>(Spezies) | Klon<br>Name | Konjugation | Hersteller                 |
|---------------------------------|------------|----------------------------------------|--------------|-------------|----------------------------|
| <b>Von Willebrand Faktor</b>    | human      | Polyklonal<br>(Kaninchen)              | A 0082       | -           | DakoCytomation<br>Dänemark |
| <b>Von Willebrand Faktor</b>    | human      | Polyklonal<br>(Kaninchen)              | P 0226       | HRP         | DakoCytomation<br>Dänemark |
| <b>Kaninchen Immunglobuline</b> | Kaninchen  | Polyklonal<br>(Ziege)                  | D 0487       | AP          | DakoCytomation<br>Dänemark |
| <b>ADAMTS13</b>                 | Human      | Polyklonal<br>(Ziege)                  | -            | -           | Baxter Innovations GmbH    |

#### Primer

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen und in lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden in dd H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 100 µM gelöst und bei -20°C gelagert. Für die Verwendung in einem PCR-Mix erfolgte eine weitere Verdünnung der Primer auf 10 µM.

Tabelle 7: Primer für die ADAMTS13-Genotypisierung

| Primer      | Sequenz                                  | Funktion             |
|-------------|------------------------------------------|----------------------|
| Adamts 5'F  | 5'-ACC CTA TCT CTG<br>GCC TGT ATT CCT-'3 | Genotypisierungs PCR |
| Adamts 5'R1 | 5'-TAC TGA CTT GTG<br>ACC ACA AGC CCT-'3 | Genotypisierungs PCR |
| Adamts 5'R2 | 5'-ATC GAG TCT AGC<br>TTG GCT GGA CGT-'3 | Genotypisierungs PCR |

### 2.2.5 Kitsysteme

Tabelle 8: Kitsysteme

| Name des Kits                                       | Hersteller                      | Funktion                                       |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|
| HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix Kit               | Qiagen<br>(Hilden, Deutschland) | Amplifikation von DNS für Genotypisierungs-PCR |
| High sensitivity mouse-cardiac Troponin-I Elisa Kit | Life Diagnostics                | Bestimmung von kardialen Maus Troponin I       |

### 2.2.6 Puffer und Gele

Tabelle 9: Puffer und Gele

| Puffer                                                                        | Zusammensetzung                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 50-fach TAE Puffer<br>(Tris-EDTA-Acetat)                                      | 2 M Tris1<br>100 mM EDTA<br>pH8 mit Essigsäure einstellen                                      |
| 1,5% Agarosegel                                                               | 1,5 g Agarose (StarPure)<br>100 ml TAE-Puffer<br>2 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10,000x) |
| Lysispuffer (zur DNA-Isolierung aus Gewebe für die Genotypisierung)           | 25 mM NaOH<br>0,2 mM EDTA<br>pH 12                                                             |
| Neutralisationspuffer (zur DNA-Isolierung aus Gewebe für die Genotypisierung) | 40 mM Tris-HCl<br>pH 5                                                                         |
| <b><u>VWF-Multimeranalyse</u></b>                                             |                                                                                                |
| Trenngelpuffer                                                                | 1% SDS<br>0,75 M Tris-HCl<br>pH 8,8                                                            |
| 1%-Trenngel                                                                   | 400 mg Agarose (Sigma, Typ VII)<br>40 ml Trenngelpuffer                                        |
| Sammelgelpuffer 1% SDS                                                        | 1% SDS<br>0,125 M Tris-HCl<br>pH 6,8                                                           |
| 0,75% Sammelgel                                                               | 187,5 mg Agarose (Seakam, HGT(P))<br>25 ml Sammelgelpuffer                                     |
| 2-fach Probenpuffer                                                           | 2% SDS<br>20 mM Tris<br>2 mM EDTA<br>pH 8,0                                                    |
| 1-fach Probenpuffer                                                           | 2% SDS<br>10 mM Tris<br>1 mM EDTA<br>pH 8,0                                                    |
| Bromphenolblau-Lösung                                                         | 0,2% Bromphenolblau<br>2% SDS<br>20 mM Tris<br>2 mM EDTA<br>pH 8,0                             |

|                       |                                                                                                              |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elektrophorese-Puffer | 0,1% SDS<br>50 mM Tris<br>384 mM Glycin                                                                      |
| Blotpuffer            | 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Lösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) |
| Blockpuffer           | 3%BSA<br>20 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>0,1% Tween-20 auf pH 7,6 einstellen                                    |
| Waschpuffer           | 20 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>0,1% Tween-20<br>pH 7,6                                                         |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 PCR-Genotypisierung

Um sicher zu gehen, dass in den jeweiligen Versuchstieren das ADAMTS13-Gen ausgeknockt war, wurden sie genotypisiert. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden gezielte Abschnitte mit den oben erwähnten Primern vermehrt und über Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Zur Gewinnung der DNA wurden etwa 1-3 mm der Schwanzspitze abgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurden 40 µl Lysispuffer (siehe Tabelle 9, Seite 36) zu der Schwanzspitze gegeben und das Gefäß 20 min bei 95°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben im Kühlschrank auf 4 °C abgekühlt und nochmals 40 µl Neutralisationspuffer (siehe Tabelle 9, Seite 36) hinzugegeben. Danach konnte die DNA aus dem Reaktionsgefäß für die PCR eingesetzt werden. Zur Aufbewahrung bei späterer Verwendung wurde die DNA bei -20°C aufbewahrt.

Das Protokoll zur Genotypisierung der ADAMTS13KO- bzw. der Wildtyp-Mäuse stammt aus dem „National Institute of Biological Innovation (NIBIO), Osaka, Japan. Die Primersequenzen sind in Tabelle 7, Seite 35, aufgelistet. Im Gel kann zwischen einer Wildtyp-Bande von ca. 616 bp Länge und einer ADAMTS13KO-Bande von ca. 350 bp Länge unterschieden werden. Die heterozygote Form zeigt im Gel beide Banden.

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Genotypisierung

| Genotypisierungs-PCR |        |
|----------------------|--------|
| Hot Star Quiagen     | 10 µl  |
| RNAse freies Wasser  | 3 µl   |
| Primer 5F            | 1 µl   |
| Primer R1            | 0,5 µl |
| Primer R2            | 0,5 µl |
| Gelred               | 2 µl   |
| DNA                  | 3 µl   |

PCR-Programm

Tabelle 11: PCR-Protokoll, Genotypisierung der ADAMTS13KO-Mäuse

| Prozess                | Temperatur | Zeit   | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95°C       | 15 min | 1      |
| Denaturierung          | 94°C       | 20 sec | 35     |
| Annealing              | 57°C       | 20 sec |        |
| Elongation             | 72°C       | 40 sec |        |
| Finale Elongation      | 72°C       | 5 min  | 1      |

**2.3.2 Retroorbitale Blutabnahme**

Die Blutabnahme zur Messung der Plättchen erfolgte über den Innenwinkel des Auges. Hierfür wurde die Maus in ein abgedichtetes Gefäß mit einem in Isofluran getränkten Tuch gegeben und betäubt. Die betäubte Maus wurde dann am Nacken gehalten und dabei die Haut am Schädel zurückgezogen, sodass die Augen leicht hervortraten. Eine etwa 1,5 cm lange Hämatokrit-Kapillare wurde dann vorsichtig in den Innenwinkel des Auges eingeführt, dadurch wurde das Blut aus dem Venenplexus herausgeleitet und so in den jeweiligen Behältern (EDTA präparierte und Natriumcitrat präparierte Reaktionsgefäße) gesammelt. Mit Hilfe des Sysmex Gerätes KX-21N, einem Blutanalysator, wurde ein Blutbild gemacht und im Anschluss Plasma gewonnen.

**2.3.3 Analyse der Blutproben mit dem Sysmex KX-21N**

Das Sysmex KX-21N (Sysmex) ist für die Analyse von humanem Blut konzipiert. Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, stand uns lediglich dieses Gerät zur Verfügung. Später waren Messungen mit dem scil Vet ABC<sup>TM</sup> Hematology Analyzer (scil Vet) möglich, das unter anderem auf die Analyse von murinem Blut spezialisiert ist. Vergleichsmessungen zwischen

scil Vet und Sysmex zeigten höhere Messwerte im scil Vet. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden jedoch alle Plättchenwerte der Arbeit mit dem Sysmex gemessen.

Um den Zusammenhang zwischen den Werten des Sysmex und des scil Vet aufzuzeigen, wurden 85 Blutproben jeweils mit beiden Geräten gemessen und anschließend die Korrelation und die lineare Regression bestimmt (siehe Abbildung 14).

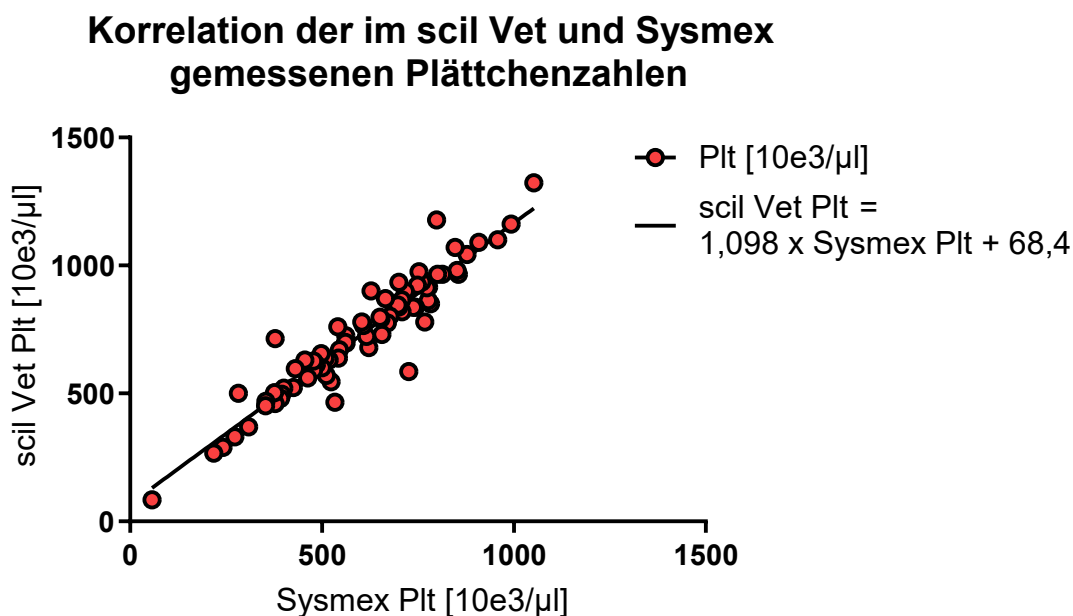


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt die Korrelation nach Pearson und die Regressionsgerade der im Sysmex und der im scil Vet gemessenen Plättchenzahlen (Plättchenzahl x 10e3/µl). Der Korrelationskoeffizient  $r$  beträgt 0,941. Es besteht eine stark positive Korrelation.

Die Korrelation erfolgte nach Pearson mit 95%-Konfidenzintervall. Der Korrelationskoeffizient  $r$  ist 0,941. Der  $p$ -Wert beträgt 0,001. Die in dieser Arbeit verwendeten Werte, welche mit dem Sysmex gemessen wurden, korrelieren stark positiv mit den Werten des mausspezifischen scil Vet-Gerätes. Die lineare Regression der Werte lässt sich mit der Funktion „scil Vet Plt = 1,098 x Sysmex Plt + 68,4“ beschreiben.

#### 2.3.4 Plasmagewinnung

Für weitere Untersuchungen des Blutes wurde EDTA-Plasma und Citrat-Plasma aus dem Blut hergestellt. Durch die Zugabe von EDTA bzw. Natriumcitrat wird die Gerinnung des frischen Blutes verhindert. Zur Herstellung des Citrat-Plasmas wurden 30 µl Natriumcitrat in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und diese dann mit dem abgenommenen Blut auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt, sodass die Verdünnung etwa 10% betrug. Zur Herstellung von EDTA-Plasma wurde ebenfalls frisch entnommenes Blut direkt in ein mit EDTA-beschichtetes Röhr-

chen gegeben. Die Probengefäße wurden dann bei 800 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden dann bei 13.000 g für 10 min zentrifugiert. Die daraus entstandenen Überstände wurden wiederum in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C aufbewahrt. Das so gewonnene Plasma diente zu weiteren Untersuchungen, wie der Troponin-Bestimmung, der LDH-Messung und der VWF-Multimeranalyse.

### **2.3.5 Blutausstriche**

Um das Blut der Mäuse auf beschädigte Erythrozyten (auch Fragmentozyten oder Schistozysten genannt) zu untersuchen, wurde eine Pappenheim-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde ein Tropfen (ca. 3 µl) frisches EDTA-Blut, links auf einen Objektträger gegeben. Ein weiterer Objektträger wurde dann von schräg oben (Winkel etwa 45°) an den Blutropfen geführt, so dass sich das Blut an der Kante entlang verteilte. Der Tropfen wurde dann im Winkel von ungefähr 45° zügig von links nach rechts über den Träger gestrichen, so dass ein dünner Film entstand. Nachdem der Ausstrich getrocknet war, wurde dieser gefärbt:

Die Blutausstriche wurden dazu 4 min in unverdünnter May-Grünwald Lösung gefärbt. Danach wurden die Objektträger zweimal kurz in Wasser (Aqua dest.) entfärbt und im Anschluss für 20 min in verdünnter Giemsa Lösung (20 ml Giemsa + 180 ml Aqua dest.) gefärbt. Zum Abschluss wurden die Objektträger zweimal in Aqua dest. entfärbt. Die Ausstriche wurden dann getrocknet und im Anschluss mit dem Mikroskop analysiert und aufgenommen.

### **2.3.6 Trigger-Untersuchungen**

#### **Genereller Versuchsablauf bei den Trigger-Untersuchungen**

Bei allen Triggerversuchen wurde, soweit nicht anders angegeben, 2 Tage vor Beginn des Versuchs Blut bei den Versuchstieren abgenommen, um deren „Normal“-Blutwerte zu ermitteln. Am Versuchstag selbst wurde den Mäusen die Triggersubstanz je nach Versuch intraperitoneal, intravenös oder per Schlundsonde verabreicht. Für die intravenöse Injektion wurde darauf geachtet, dass der Bolus das Volumen von 5ml/kg KG nicht überschritt. Nach einer definierten Zeiteinheit wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert. Die Injektion hierzu erfolgte intraperitoneal. Es folgte eine retroorbitale Entblutung der Tiere (siehe Seite 38). Das Blut wurde dann mittels Sysmex analysiert und im Anschluss Plasma gewonnen (siehe Punkt 2.3.4., Seite 39). Nach dem Entbluten der Mäuse wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt und Organe (Herz, Niere, Gehirn) entnommen.

**Gabe von rekombinantem, humanem Von-Willebrand-Faktor**

Zur Titration des VWF wurde den Mäusen -unter Betäubung- 5-2 Tage vor Versuch retroorbital etwa 30 µl Blut entnommen und mittels des Sysmex' das Blutbild erstellt. Die Gabe von von 800 IE (internationale Einheiten) pro kg KG (Körpergewicht), 500 IE/kg KG, 250 IE/kg KG und 100 IE/kg KG rhVWF wurde untersucht. Um die intravenöse Injektion in die laterale Schwanzvene durchzuführen, wurden die Mäuse in einem Mäuseschreck fixiert und der Mausschwanz etwa 1 Minute in warmes Wasser getaucht. Dadurch weiten sich die Blutgefäße und eine Injektion wird erleichtert. Zur Injektion des rhVWF wurde eine Kanüle der Größe 26G verwendet.

**Gabe von Wilfactin**

Bei der Gabe von Wilfactin wurden die Mäuse mit 500 IE/kg behandelt. Die Injektion erfolgte i.v. über die laterale Schwanzvene. Nach 8 h wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, entblutet und die Organe entnommen.

**Gabe von Kogenate®**

Kogenate® wurde in einer Konzentration von 800 IE/kg i.v. injiziert. Die Injektion erfolgte i.v. über die laterale Schwanzvene. Nach 8 h wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, entblutet und die Organe entnommen.

**Gabe von Histonen mit und ohne Zugabe von rhVWF**

Zur Untersuchung der Wirkung wurden Histone aus dem Kälberthymus in Konzentrationen von 25 mg/kg und 50 mg/kg verwendet. Die Histone wurden in Pulverform gekauft und mit PBS verflüssigt. Zur Verstärkung des Effekts wurden in einem weiteren Versuch zusätzlich 100 IE/kg rhVWF injiziert. Die Injektion erfolgte ebenfalls über die laterale Schwanzvene. Die Mäuse standen nach Injektion unter Beobachtung, um bei auffälligem Verhalten den Versuch zu beenden. Nach ca. 20 Minuten wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, entblutet und die Organe entnommen.

**Gabe von Lipopolysacchariden und rhVWF**

Für die Gabe von LPS von E. coli 0111: B4 wählten wir eine Menge von 1 mg/kg bis 2 mg/kg LPS, welche i.v. in die laterale Schwanzvene injiziert wurde. Das Wohlbefinden der Tiere wurde während des Versuchs regelmäßig überprüft. Etwa 5 Stunden nach LPS-Gabe wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, entblutet und die Organe entnommen. In einem weiteren Versuch wurden den Mäusen zusätzliche 100 IE/kg rhVWF verabreicht.

**Gabe von Quensyl® (Hydroxychloroquin)**

Quensyl®, das Chininderivat, wurde in einer Konzentration von 6,5 mg/kg i.v. injiziert. Nach Auskunft von Dr. med. Davit Manukyan (Zentrallabor, Universitätsmedizin Mainz), ist die

höchste Konzentration in den Mäusen etwa 3 h nach Einnahme von Quensyl® zu beobachten, danach lässt die Konzentration im Blut nach (Edwards et al., 1997). Das Blut der Mäuse wurde daher 3 h nach Gabe von Quensyl® abgenommen und gemessen. Im Anschluss wurden die Tiere geopfert.

### **Gabe von Ticlopidin**

Für die Gabe von Ticlopidin wurden 250 mg Filmtabletten Ticlopidin mit einem Mörser zerstoßen und mit Wasser verflüssigt. Es wurden 10 mg/kg Ticlopidin oral per Schlundsonde verabreicht und 100 IE/kg rhVWF injiziert. 8 h nach Gabe von rhVWF wurden die Mäuse entblutet und die Organe entnommen.

### **Gabe von Gemcitabin**

Zur Untersuchung der Triggerwirkung von Gemcitabin, wurde „Gemcitabine hydrochloride“ der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Gemcitabin wurde als akkumulative Menge von 50 mg/kg verabreicht. Die Tiere wurden 5 Tage mit je 10 mg/kg Gemcitabin behandelt. Hierzu wurde die Substanz intraperitoneal injiziert. Am fünften Tag wurden den Tieren morgens zusätzlich 100 IE/kg rhVWF injiziert. 8 h nach Gabe von rhVWF wurden die Mäuse entblutet und die Organe entnommen.

### **Gabe von Mitomycin**

Im Vorversuch wurden Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 4 und 8 mg/kg Mitomycin getestet. Die Konzentrationen wurden anhand der Arbeit von Sato et al. gewählt (Sato et al., 1989). Der Versuch wurde aufgrund der Plättchenwerte mit 8 mg/kg durchgeführt. Die Mäuse wurden i.p. injiziert und 8 h später geopfert.

### **2.3.7 Lactatdehydrogenase-Assay**

Da, wie in Punkt 1.1.3 beschrieben, das Vorkommen von Fragmentozyten und Petechien wichtige Merkmale der TTP sind, sollte bei dieser Arbeit auch die LDH-Konzentration als Parameter der Zellschädigung und der Hämolyse untersucht werden. Die Werte wurden mit dem LDH-Analysegerät „Architect c8000“ (Abbott Laboratories) im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz gemessen. Hierzu musste das Plasma auf ein Mindestvolumen von 120 µl mit NaCl verdünnt werden.

### **2.3.8 Troponinbestimmung**

Die Troponinwerte der behandelten Mäuse wurden mittels dem „High sensitivity mouse cardiac Troponin-I Elisa Kit“ von Life Diagnostics gemessen. Dieses Kit wurde speziell für die Messung von kardialem Troponin I in Mäusen entwickelt. Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-Elisa mit Coat-Antikörper. In die Wells der beschichteten Platte wurde eine Tropa-

nin-Standardreihe sowie die jeweiligen Proben gegeben und die Platte 60 min auf einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Dann wurde die Platte gewaschen (nach Anleitung) und ein HRP-cTnI-Konjugat hinzugefügt und die Platte anschließend für 1 h inkubiert. Nach Hinzugeben der TMB-Lösung wurde die Platte nochmals 20 min inkubiert. TMB (Tetramethylbenzidin) ist ein Substrat der Meerrettich Peroxidase (HRP für horseradish-peroxidase). Die Peroxidase-Reaktion bewirkt einen Farbumschwung nach Blau.

Nach der Inkubationsdauer wurde die Reaktion durch 1 N HCl gestoppt. Die cTnI-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden über Absorptionsmessung bei 450 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.

### **2.3.9 Von-Willebrand-Faktor-Multimeranalyse**

Im Plasma findet man verschiedene Multimergrößen des VWF vor. Durch die verminderte ADAMTS13-Aktivität besitzen TTP-Patienten vermehrt UL-VWF-Multimere. Zur Untersuchung der ADAMTS13KO-Mäuse wurde das Blut auf die für TTP-Patienten typischen UL-VWF-Multimere untersucht. Hierfür wurden die Citrat-Plasmaproben auf ein SDS-Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die im Gel nach Größe aufgetrennten Proben wurden dann mittels Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Proteine auf der Membran im Anschluss mit Hilfe von Antikörpern gefärbt. Die Zusammensetzung der Puffer und Gele ist in Tabelle 9 (Seite 36) aufgeführt. Es wurde wie folgt vorgegangen:

#### Vorbereitung (1.Tag)

Vor Beginn des Versuchs wurden der Elektrophorese Puffer, der Trenngelpuffer, der Sammelgelpuffer und der Probenpuffer angesetzt. Die Glasplatten wurden in einem Wärmeschränk bei ca. 70 °C warm gestellt.

#### Ansetzen der Proben

Tiefgefrorene Plasmaproben wurden für 10 min bei 37 °C aufgetaut, gevortext und kurz zentrifugiert. Für die Untersuchung von Mausplasmaproben wurden je 20 µl Mausplasma mit 20 µl Probenpuffer versetzt; Für die Untersuchung von TTP-Patienten-Proben wurden 5 µl Plasma mit 35 µl Probenpuffer verdünnt. Die Proben und Kontrollansätze wurden dann 30 min bei 57 °C im Wasserbad inkubiert.

#### Vorbereitung und Herstellung des Gels

Zwei Glasplatten (26,5 x 12,5 cm, 2-3 mm dick) wurden mit vergälltem Ethanol gereinigt und mit Hilfe von Klammern und Gummiabdichtungen so zusammengesetzt, dass ein etwa 3 mm dickes Gel gegossen werden konnte. Die Glasplatten und eine Pipette zum Gießen des Gels wurden in einem Wärmeschränk bei etwa 70 °C vorgewärmt.

Das 1% Trenngel wurde dann in der Mikrowelle aufgeköcht, mit der Pipette aufgezogen und blasenfrei in die vorgewärmten Glasplatten gegossen. Die Glasplatten wurden zunächst 15-20 min bei Raumtemperatur ausgehärtet und später für 1 h im Kühlschrank abgekühlt.

Nach einer Stunde wurde die obere Glasplatte mit einem dünnen Spatel vorsichtig vom Gel abgenommen und etwa 2 cm des oberen Gelstückes abgetrennt (um ein stets einheitlich großes Trenngel zu erhalten, legt man das Gel z.B. auf eine vorbereitete Schablone).

### Sammelgel-Herstellung

Das 0,75%-Sammelgel dient der Fokussierung der Banden. 225 mg Agarose (Seakam HET (P) Agarose Cat. 50050) und 30 ml Sammelgelpuffer wurden im Erlenmeyerkolben aufgeköcht. Das Trenngel wurde dann zum Angießen des Sammelgels auf einen ebenen Tisch gelegt und mit Gummistreifen seitlich abgedichtet. Mit einer senkrecht gehaltenen 25 ml Plastikpipette wurde nun das Sammelgel gegossen. Die Ladetaschen für die Proben wurden mit Hilfe eines speziell angefertigten Kamms ausgespart. Der Rest des Sammelgels wurde im Wasserbad bei 62 °C aufbewahrt.

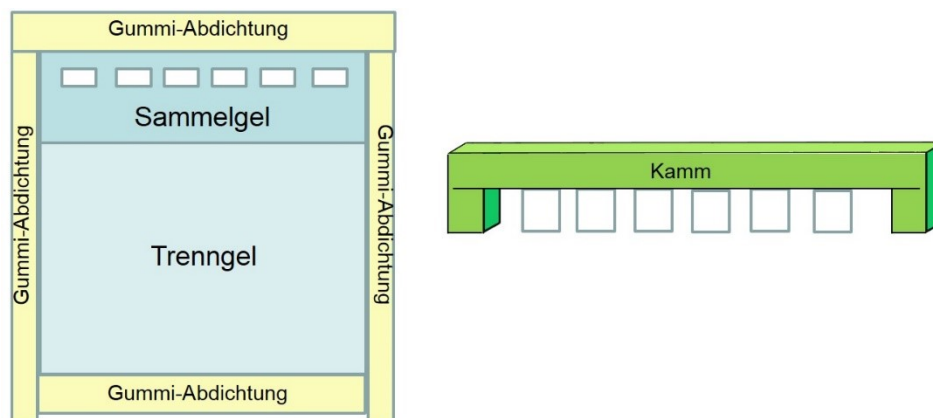


Abbildung 15: Gießen des Multimergels. Zum Angießen des Sammelgels wird das Trenngel auf einer ebenen Fläche gelegt und mit Gummiabdichtungen umrandet. Der Kamm wird über die noch leere Fläche für das Sammelgel gestellt und dient der Aussparung für die Ladetaschen. Das Sammelgel wird dann innerhalb der Abdichtungen gegossen.

### Elektrophorese

Die Elektrophorese-Kammer wurde mindestens 1 h vor Gebrauch mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Das Gel wurde dann mitsamt Glasplatte luftblasenfrei auf die Kühlplatte gelegt. Je 3 dünne Gel-Blotting Papiere wurden an das Gel angelegt und dienten als Verbindung zwischen Puffer und Gel. Es wurden dann pro Ladetaschetasche 40 µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Anschluss 2 h bei 13 mA laufen gelassen. Nach 2 h wurden die Sammel-taschen mit dem restlichen Sammelgel (s.o.: im Wasserbad aufbewahrt) verschlossen und bei

15 mA über Nacht etwa 23-25 h laufen gelassen. Die Elektrophorese-Apparatur muss während der gesamten Zeit des Laufes auf 4 °C gekühlt werden.

## 2.Tag

### Blotten

Nachdem die Elektrophorese abgestoppt wurde, wurde das Gel 15 min mit der Glasplatte in den restlichen Elektrophorese-Puffer gelegt. Ein Blotpuffer wurde angesetzt (Konzentrat 1:60 mit Aqua dest. verdünnen; 50 ml Konzentrat auf 3 l und 15 ml auf 900 ml verdünnen) und die Blotkammer damit gefüllt. Die Kühlschlange wurde dann in die Blotkammer eingehängt und die Temperatur auf 0 °C eingestellt. Ein Rührfisch wurde in die Blotkammer gegeben und während des Blottens wurde gerührt.

Als nächstes wurde die Nitrocellulose-Folie (NC) vorbereitet. Beim Arbeiten mit NC-Folie ist es wichtig, Handschuhe zu tragen. Die Folie wurde auf eine Größe von 12 x 9 cm zugeschnitten. Die Blotkassette sowie zwei Schwammeinlagen wurden in eine mit Blotpuffer gefüllte Schale gelegt und mit Puffer getränkt. Für den Blot wurden dann verschiedene Schichten aufeinander gelagert. Hierzu wurde die Blotkassette in die Schale gelegt. Auf die durchsichtige Seite der Kassette (+ Pol) wurde zunächst eine in Blotpuffer eingelegte Schwammeinlage und darauf ein dickes Blotpapier gelegt. Eventuelle Luftblasen wurden mit einer Walze entfernt. Danach wurde die NC-Folie aufgelegt und auf diese das Gel. Dann folgten ein weiteres Blotpapier und eine Schwammeinlage.

Die Reihenfolge war wie folgt:

1. durchsichtige Seite der Blotkassette (Plus-Pol)
2. Schwammeinlage
3. Blotpapier
4. Nitrocellulose Papier
5. Gel
6. Blotpapier
7. Schwammeinlage
8. Schwarze Seite der Blotkassette (Negativ-Pol)

Die Kassette wurde dann geschlossen und in die mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer bei 1,0 A (Ampere konstant) für 180 min geblottet.

**Nach dem Blotten** wurde die Folie in eine flache Plastischale gegeben und kurz mit Aqua dest. gespült. Die Folie wurde dann mit 1 x TBS/T-Puffer gewaschen und im Anschluss für

etwa 1 h mit 100 ml 3% BSA -TBS/T-Puffer geblockt.

Danach wurde ein Antikörper-Gemisch (100 ml mit 50 µl AK, Anti Human Polyclonal Rabbit VWF) (DAKO 0082 VWF) hinzugefügt und die Schale über Nacht auf den Schüttler gestellt. Am nächsten Tag wurde die Folie mit 1x TBS-T 4-mal gewaschen, dann mit 1:1000-fach verdünntem AK versetzt (100 ml 1 x TBS-T mit 100 µl AK: Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulin AP).

### Färbung

Nach ca. 2-3 h wurde der Antikörper abgenommen und die Folie mit 1 x TBS-T gewaschen (ca. 10-20 min). Vier Färbetabletten (Orthophenyldiamin) wurden in 40 ml H<sub>2</sub>O gelöst und so die Folie gefärbt, danach wurde mit H<sub>2</sub>O abgeblockt. Die Folie musste im Anschluss zügig gescannt werden und konnte dann ausgewertet werden.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graphpad Prism 6. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen dem jeweiligen Mittel wurde mit dem ungepaarten Student t-Test (Gilt für Vergleiche von 2 Gruppen) oder Anova (mehr als 2 Gruppen) durchgeführt. Signifikanzen sind als Stern dargestellt und wurden mit dem ungepaarten t-Test berechnet. Die Signifikanz wurde wie folgt gewertet: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse werden stets als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) präsentiert.

Die Auswertung mit einem Student t-Test und Anova wurde nach Absprache auf Empfehlung des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genotypisierung

Die Mäuse aus jedem Wurf des ADAMTS13KO-Mausstamms wurden genotypisiert. Die ADAMTS13KO-Bande befand sich bei etwa 350 bp, die Wildtyp-Bande bei ca. 616 bp Länge. Heterozygote Tiere wie in Abbildung 16, Bande 1 wurden weiter für die Zucht verwendet. Homozygote Tiere wurden für die Versuche verwendet.

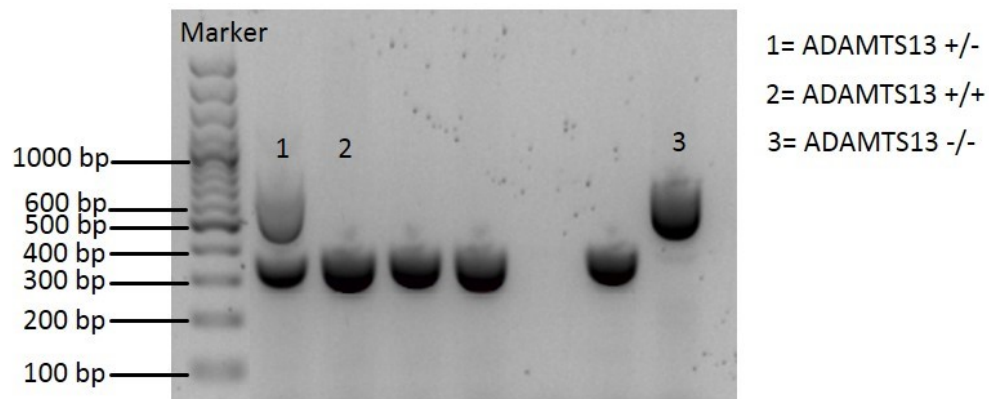


Abbildung 16: Gelbild zur Genotypisierung der ADAMTS13KO-Mäuse.

### 3.2 VWF-Multimeranalyse

Mit Hilfe des VWF-Multimer-Gels wurde der VWF in seine verschiedenen Multimergrößen aufgetrennt und Unterschiede in den einzelnen Plasmaproben wurden sichtbar gemacht.

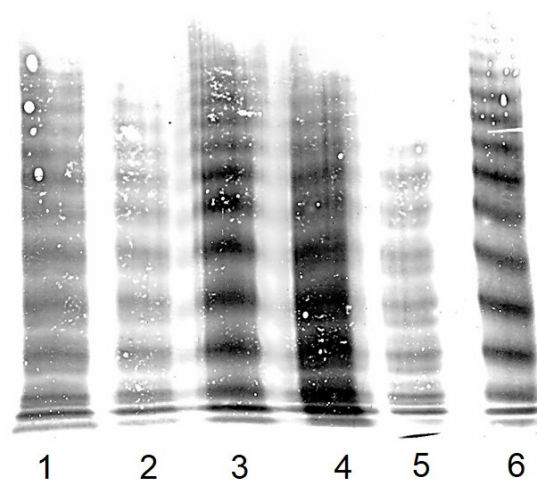


Abbildung 17: VWF-Multimer gel mit VWF-Banden. Bande 1 ist eine Plasmapoolprobe von Menschen. Bande 2 ist die Plasmaprobe einer Wildtyp-Maus und Bande 3 die Probe einer mit 800 IE/kg rhVWF behandelten ADAMTS13KO-Maus. Bande 4 ist die Probe einer unbehandelten ADAMTS13KO-Maus. Bande 5 zeigt eine Wilfactin-Bande und Bande 6 stellt rekombinanten humanen VWF dar.

Auf dem Gel (Abbildung 17) erkennt man die gelelektrophoretische Auftrennung der VWF-Multimere. Die kleinen, gespaltenen VWF-Monomere und Teile wandern am schnellsten und befinden sich daher am weitesten entfernt vom Startpunkt (im Bild „unten“). Je größer das Protein, desto langsamer wandert es, was bedeutet, dass sich die großen Multimere nah am Startpunkt befinden. Die erste Spur, die Plasmapoolprobe, besitzt sowohl sehr große (UL-Multimere und ungespaltenen VWF) als auch kleine Teile des VWF. Vergleicht man die Wildtyp-Bande (**Bande 2**) sieht man, dass die sehr großen VWF-Multimere fehlen. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen erkennt man bei den ADAMTS13KO-Mäusen (**Banden 3 und 4**), dass größere Multimere vorhanden sind. Das Fehlen der ADAMTS13-Protease bei den Mäusen führt dazu, dass sie UL-VWF-Multimere besitzen. Bande 3 ist eine mit 800 IE/kg behandelte ADAMTS13KO-Maus. Der Startpunkt der Bande verläuft bereits sehr weit oben. Ebenso wurden reines Wilfactin und rhVWF getestet. Im plasmatischen Wilfactin (**Bande 5**) sind keine großen Multimere zu sehen, im rekombinanten VWF-Präparat (**Bande 6**) hingegen findet man auch UL-VWF-Multimere.

### 3.3 Triggerversuche

Die folgenden Ergebnisse der Triggerversuche wurden alle wie in Punkt 2.4, Seite 46, aufgeführt, ausgewertet. Die Konzentrationen der verschiedenen Substanzen verstehen sich pro Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG).

#### 3.3.1 Titration mit rhVWF

Um den rhVWF auszutitrieren, wurden verschiedene Konzentrationen des Proteins (800 IE/kg, 500 IE/kg, 250 IE/kg und 100 IE/kg) an den Mäusen getestet. Es wurden die Plättchenzahl, der Hämoglobinwert, der LDH-Wert und die Troponinkonzentration bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen miteinander verglichen. Außerdem wurden Blutaussstriche angefertigt.

### Gabe von 800 IE/kg rhVWF

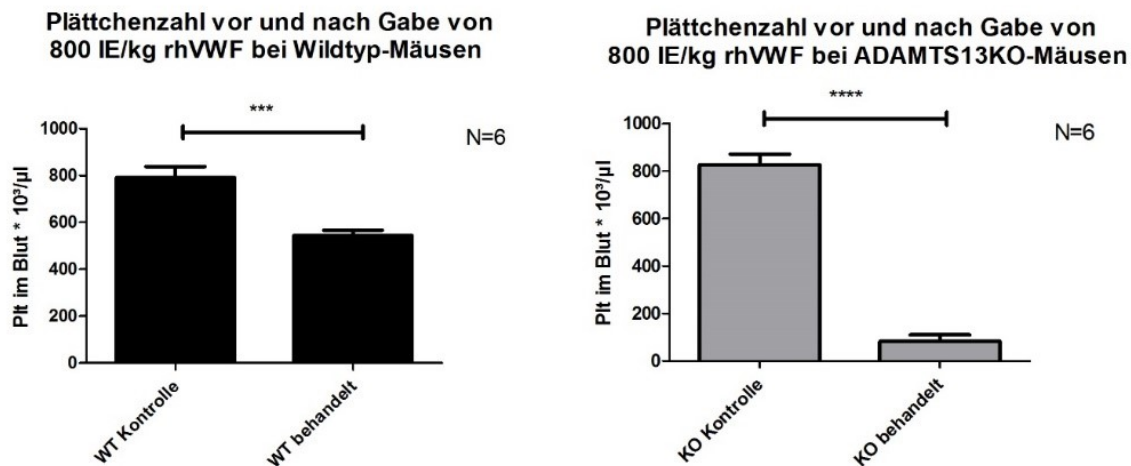


Abbildung 18: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. „Kontrolle“ ist hierbei die Gruppe 2 Tage vor Versuch und „behandelt“ die Gruppe 8 h nach Injektion am Versuchstag. Aufgetragen ist die Plättchenzahl (Y-Achse) gegen die Wildtyp- bzw. ADAMTS13KO-Mausgruppe (X-Achse). Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\*\* =  $p < 0,001$ )

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $791,3 \pm 46,51 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $544 \pm 22,71 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $827 \pm 43,30 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $84 \pm 26,55 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Der Plättchenverbrauch lag bei den Wildtyp-Mäusen bei durchschnittlich 31%. Die ADAMTS13KO-Mäuse zeigten einen Plättchenverbrauch von etwa 90%. Man erkennt, dass die hohe Konzentration von 800 IE/kg rhVWF sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen einen signifikanten Plättchenverbrauch bewirkt.

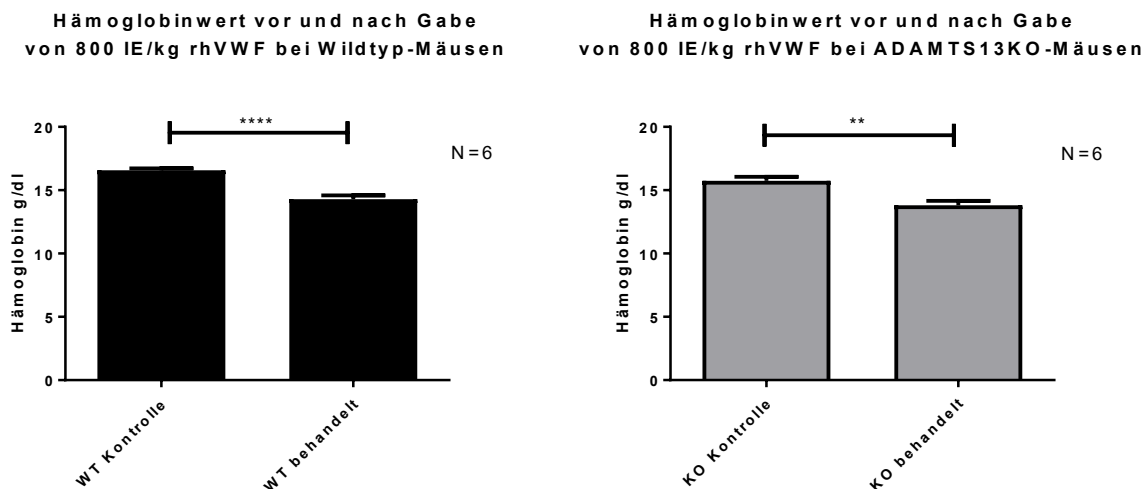


Abbildung 19: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Hämoglobinwert der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $16,57 \pm 0,1542$  g/dl und nach Behandlung  $14,28 \pm 0,3038$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $15,73 \pm 0,3201$  g/dl und nach Behandlung  $13,80 \pm 0,3615$  g/dl.

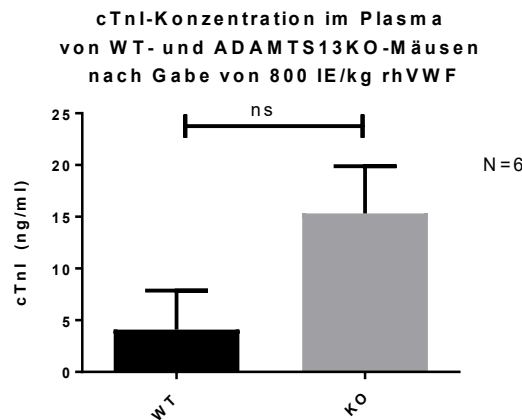


Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $4,093 \pm 3,773$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $15,32 \pm 4,554$  ng/ml. Beide Gruppen zeigen eine starke Erhöhung des Troponinwerts. Es sind deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäuse zu erkennen, statistisch ergibt sich jedoch aufgrund der Streuung keine Signifikanz. Die starke Streuung zeigt, dass nur ein Teil der Tiere Schäden am Herzen erlitten hat.

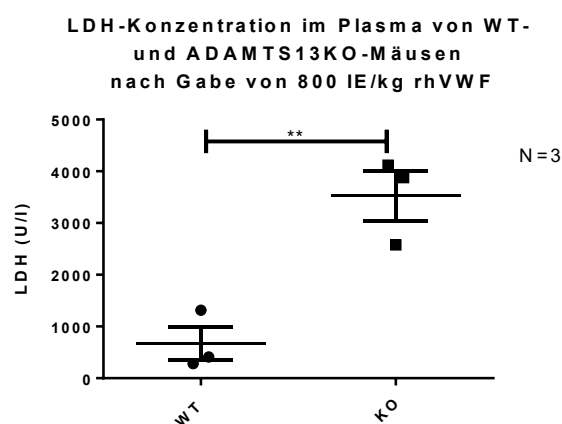


Abbildung 21: Vergleich der LDH-Konzentration zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 800 IE rhVWF/kg.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $668,3 \pm 326$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Konzentration  $3525 \pm 478,5$  U/l. Der Unterschied ist signifi-

kant. Wir sehen eine leichte Erhöhung des LDH-Werts in den Wildtyp-Mäusen und extrem hohe Werte in der ADAMTS13KO-Gruppe.

#### Gabe von 500 IE/kg rhVWF

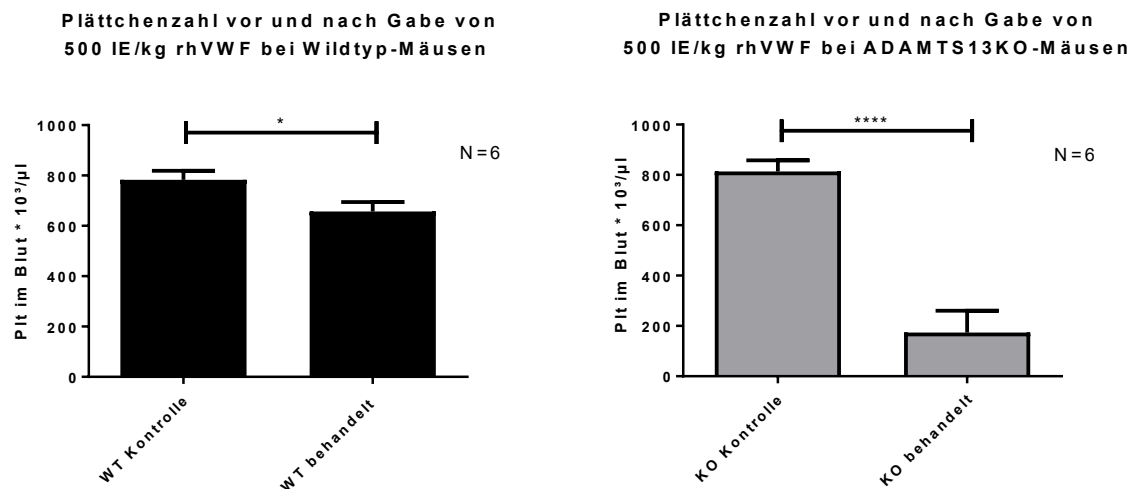


Abbildung 22: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO- Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $782,7 \pm 36,02 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $656,8 \pm 37,88 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 16%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $813,8 \pm 43,69 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $173,7 \pm 86,97 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenverbrauch von durchschnittlich 79%. Der Plättchenabfall der ADAMTS13KO-Mäuse ist sehr deutlich erkennbar und zeigt eine starke Signifikanz.

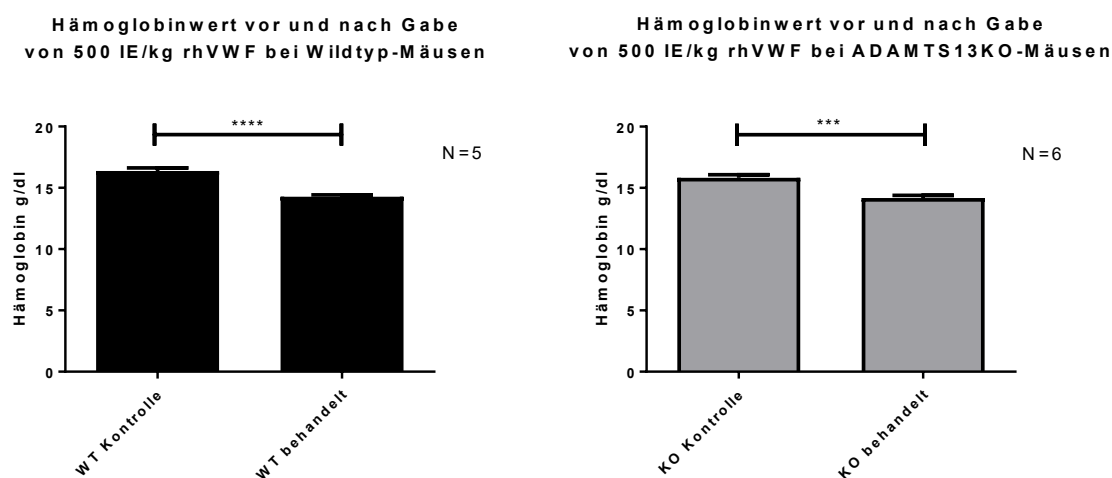


Abbildung 23: Vergleich des Hämoglobinwerts 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,38 \pm 0,2417$  g/dl und nach Behandlung  $14,28 \pm 0,1530$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,82 \pm 0,2600$  g/dl und nach Behandlung  $14,18 \pm 0,2151$  g/dl.

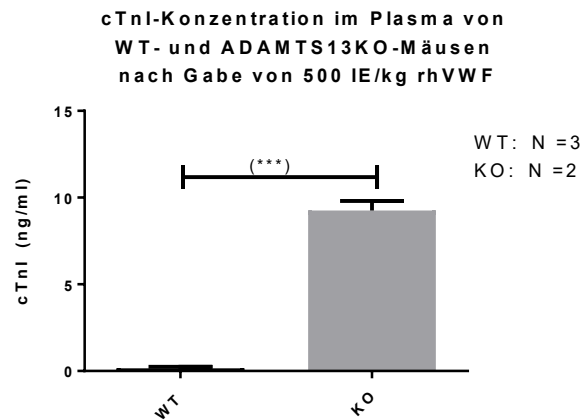


Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,160 \pm 0,08505$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $9,250 \pm 0,550$  ng/ml.

Da die Gruppen ungleich groß gewählt sind, ist die Signifikanz nicht aussagekräftig. Tendenziell unterscheiden sich die Werte aber deutlich, was folgend dargestellt ist:

cTnI-Werte nach Gabe von 500 IE/kg rhVWF:

| WT   | ADAMTS13KO |
|------|------------|
| 0    | 9,8        |
| 0,19 | 8,7        |
| 0,29 | -          |

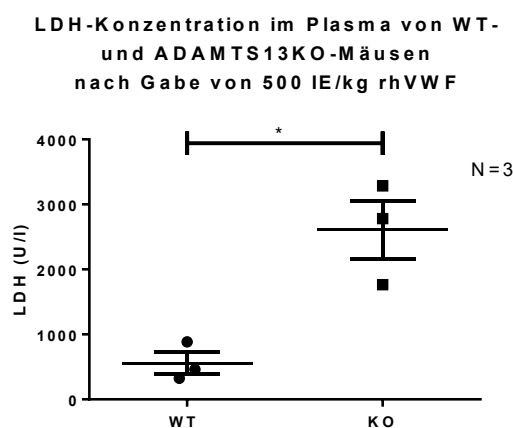


Abbildung 25: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $556,7 \pm 168,4$  U/l. Wir erkennen sehr hohe Werte in der ADAMTS13KO-Gruppe. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Konzentration  $2610 \pm 447,1$  U/l. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

#### Gabe von 250 IE/kg rhVWF

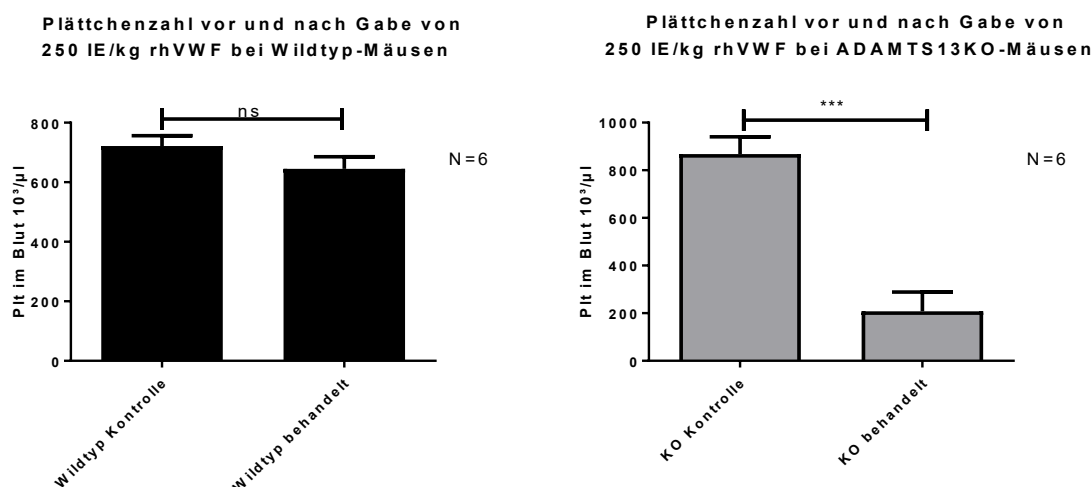


Abbildung 26: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $721,5 \pm 34,86 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $644,7 \pm 40,92 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 11%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen ist ein starker Abfall zu beobachten. Dort betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $867,5 \pm 72,54 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $207,5 \pm 81,11 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 76%.

Die Behandlung mit 250 IE/kg rhVWF führte bei den Wildtyp-Mäusen zu keinem signifikan-

ten Plättchenverbrauch. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen hingegen war ein signifikanter Abfall zu beobachten.

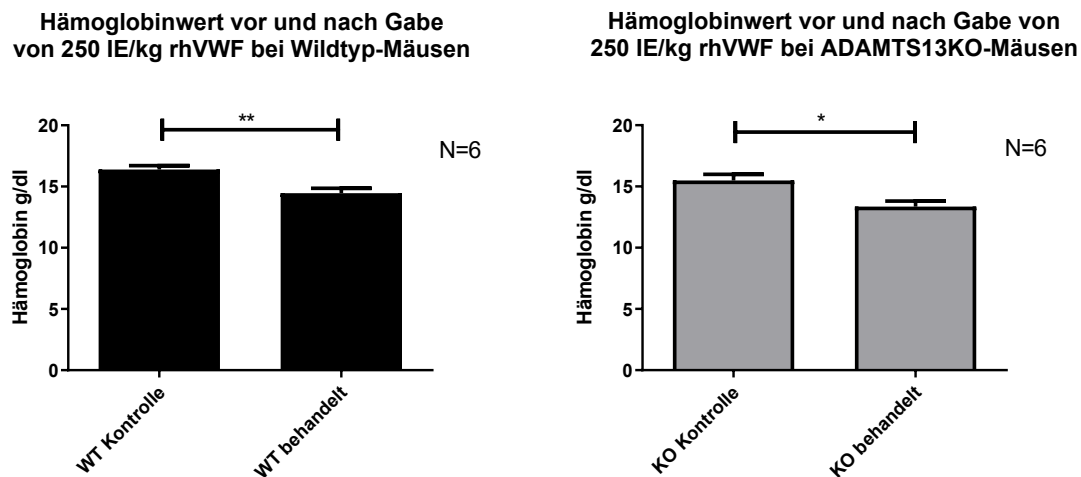


Abbildung 27: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Gabe von 250 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

In den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung mit 250 IE/kg rhVWF  $16,38 \pm 0,3188$  g/dl und nach Behandlung  $14,45 \pm 0,4006$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,48 \pm 0,5108$  g/dl und nach Behandlung  $13,35 \pm 0,4573$  g/dl.

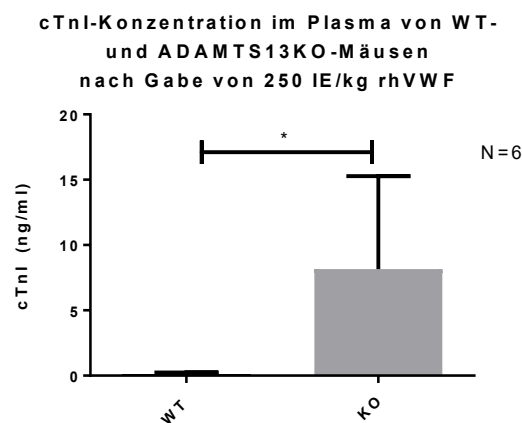


Abbildung 28: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,1183 \pm 0,05350$  ng/ml nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $8,162 \pm 2,902$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen fällt eine starke Streuung der Werte auf. Wir finden 1,1 ng als niedrigsten Wert und 17,4 ng als höchsten gemessenen Troponin-Wert in der gleichen Gruppe. Wie bereits erwähnt, bedeutet ein hoher Wert, dass das jeweilige Tier Schä-

den am Herzmuskel erlitten hat; in der ADAMTS13KO-Gruppe finden wir 3 Tiere mit hohen Werten (vgl. „Limitationen“, Seite 87). Die ADAMTS13KO-Gruppe hat signifikant höhere Troponin-Werte als die Wildtyp-Mäuse.

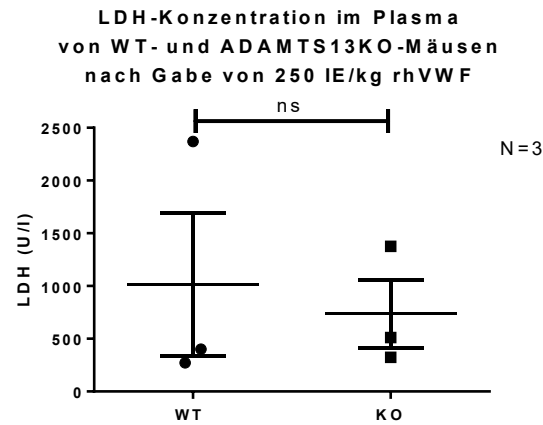


Abbildung 29: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $1014 \pm 678,7$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $737,0 \pm 324,0$  U/l. Die Werte sind in beiden Gruppen erhöht. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

#### Gabe von 100 IE/kg rhVWF

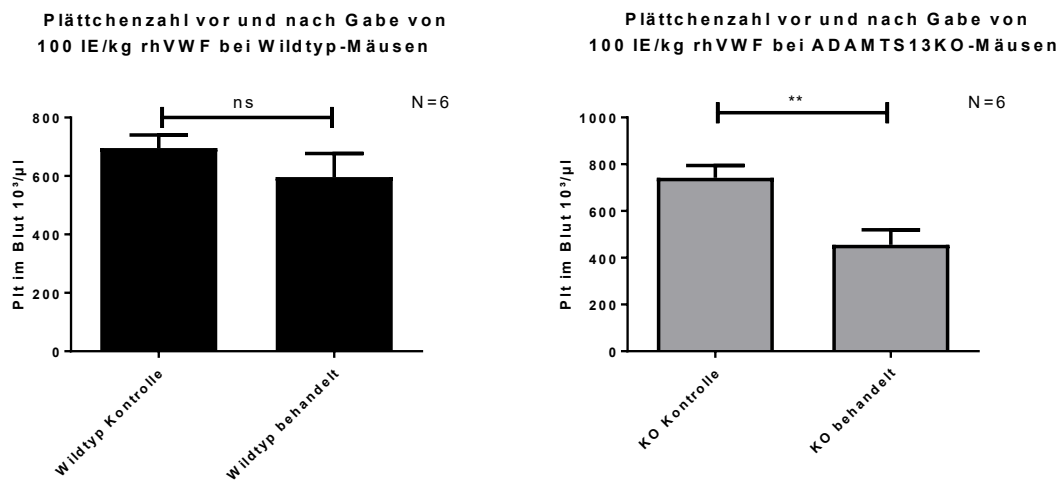


Abbildung 30: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $695,7 \pm 44,66 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $596,0 \pm 81,00 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 16%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $742,3 \pm 52,63 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $455,3 \pm 64,55 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von

durchschnittlich 39%. Bei den Wildtyp-Mäusen ist kein signifikanter Abfall in der Plättchenzahl zu erkennen. Die ADAMTS13KO-Mäuse weisen einen signifikanten Abfall auf.

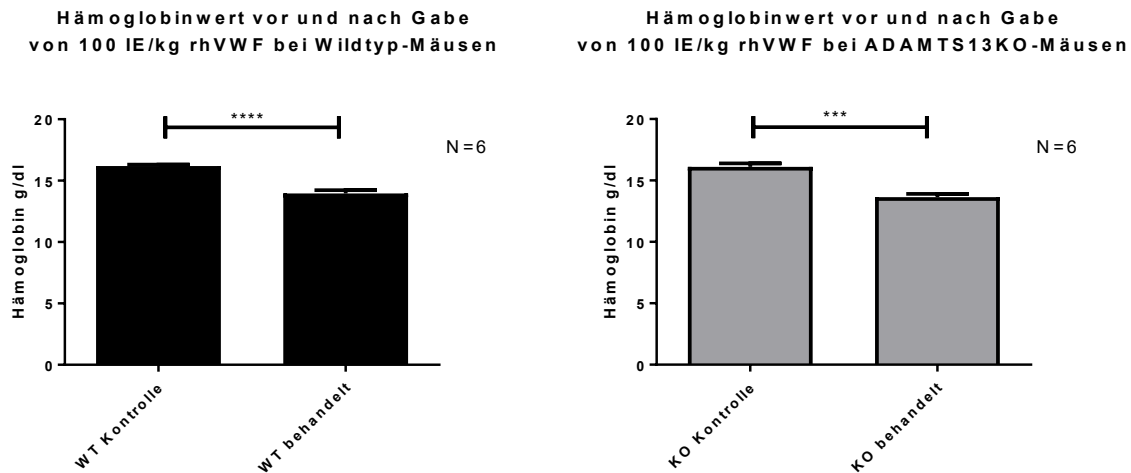


Abbildung 31: Vergleich des Hämoglobinwerts bei WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,18 \pm 0,1167$  g/dl und nach Behandlung  $13,95 \pm 0,2693$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,1 \pm 0,291$  g/dl und nach Behandlung  $13,63 \pm 0,2789$  g/dl. Die Werte waren in beiden Gruppen signifikant; in der Wildtypgruppe war die Signifikanz etwas stärker.

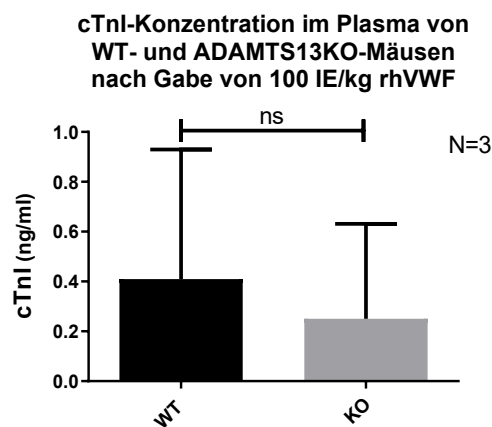


Abbildung 32: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug nach Gabe von 100 IE/kg rhVWF  $0,4100 \pm 0,3002$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,2500 \pm 0,2201$  ng/ml. Man erkennt, dass bei dieser Behandlung sehr niedrige cTnI-Werte gemessen werden und die Werte sich zwischen Wildtyp und ADAMTS13KO-Mäusen nicht stark unterscheiden.

### 3.3.2 Gabe von Wilfactin

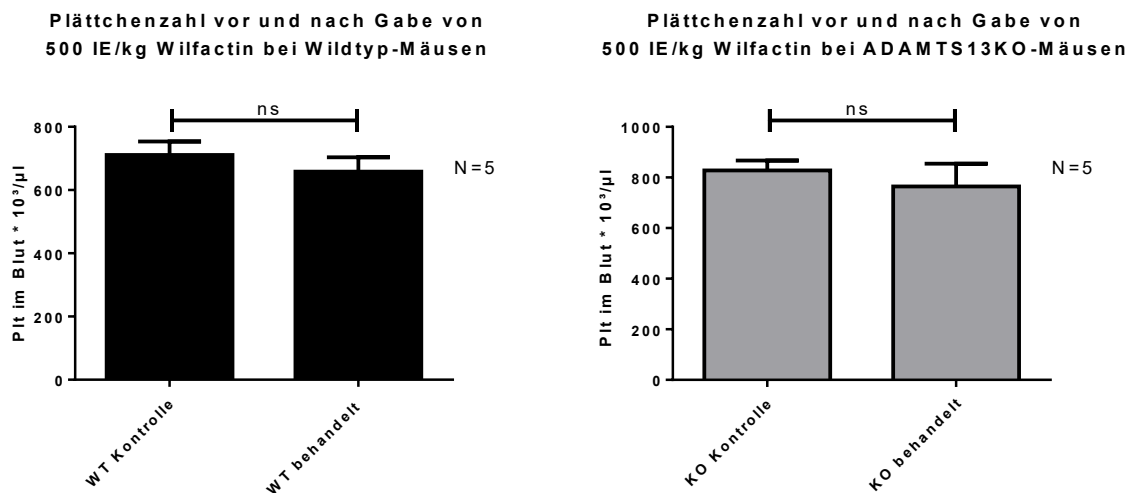


Abbildung 33: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach i.v. Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Im Wilfactin-Versuch betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $710,8 \pm 42,98 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $658,4 \pm 45,19 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 7%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $828,0 \pm 38,69 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $764,6 \pm 90,25 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 16%. Es gab keinen signifikanten Abfall der Plättchenzahl in beiden Gruppen.

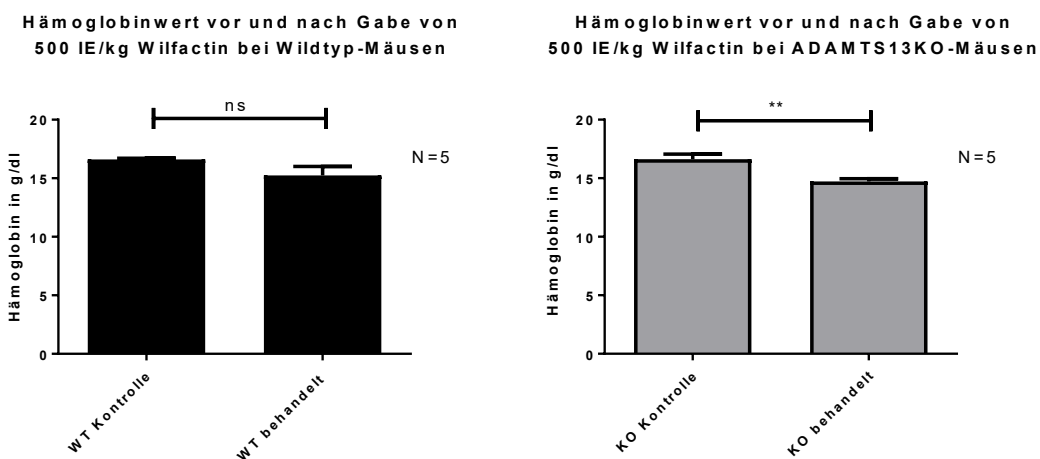


Abbildung 34: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach i.v. Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,60 \pm 0,1049$  g/dl und nach Behandlung  $15,24 \pm 0,7698$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert

vor Behandlung  $16,62 \pm 0,4386$  g/dl und nach Behandlung  $14,72 \pm 0,2354$  g/dl. Eine signifikante Veränderung ist in der ADAMTS13KO-Gruppe zu beobachten.

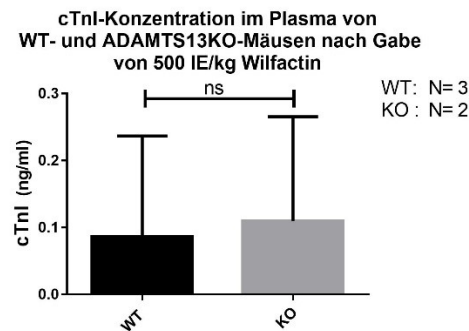


Abbildung 35: Vergleich der Konzentration von kardialen Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug nach Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin  $0,08667 \pm 0,08667$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,1100 \pm 0,1100$  ng/ml. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich und sehr niedrig, was dafür spricht, dass Wilfactin keinerlei Einfluss auf die Mäuse nimmt. Es gilt zu beachten, dass N bei ADAMTS13KO nur 2 ist.

### 3.3.3 Gabe von Kogenate®

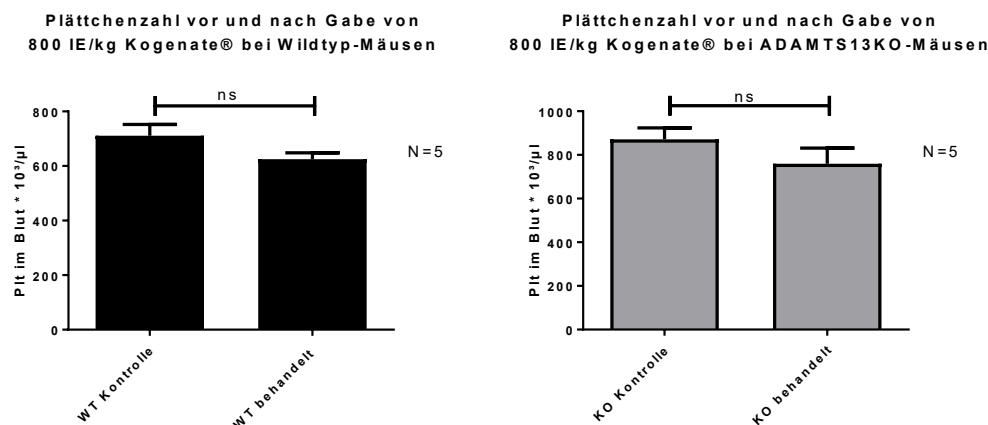


Abbildung 36: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 2h nach Injektion mit 800 IE/kg Kogenate®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Nach Kogenate® Gabe betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $711,2 \pm 41,09 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $624,8 \pm 23,58 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 12%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Be-

handlung  $871,6 \pm 51,88 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $759,4 \pm 71,71 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 13%. Der Abfall ist in beiden Gruppen nicht signifikant.

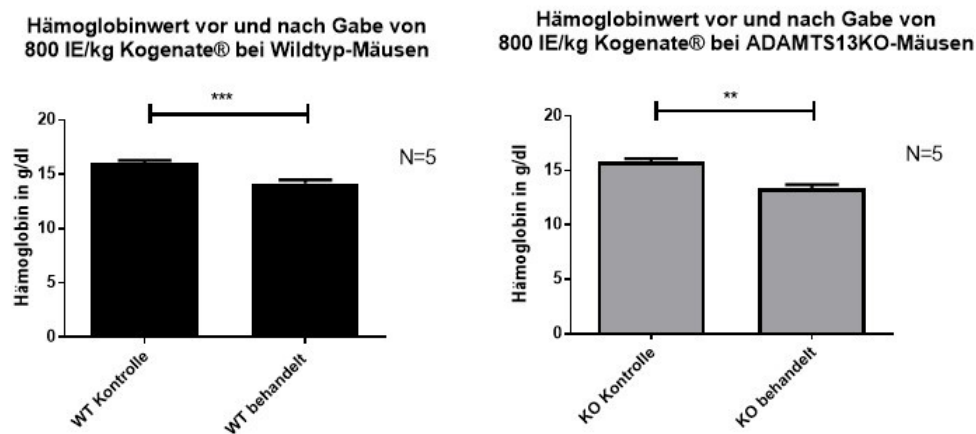


Abbildung 37: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 800 IE/kg Kogenate®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung mit 800 IE/kg Kogenate®  $16,08 \pm 0,1985$  g/dl und nach Behandlung  $14,16 \pm 0,3108$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,80 \pm 0,2983$  g/dl und nach Behandlung  $13,34 \pm 0,3881$  g/dl.

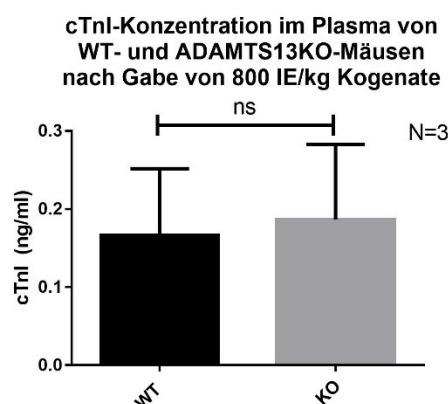


Abbildung 38: Vergleich der Konzentration von kardialen Troponin I (cTnI) zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 800 IE/kg Kogenate®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug nach Gabe von 800 IE/kg Kogenate®  $0,1667 \pm 0,08511$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,1867 \pm 0,09615$  ng/ml. Die Werte waren niedrig; es gab keinen signifikanten Unterschied.

Die Abbildung zur LDH-Konzentration ist hier nicht aufgeführt, da N nur 2 ist. In den Wildtyp-Mäusen betrug die Konzentration im Mittel  $838,5 \pm 210,5$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-

Mäusen betrug die mittlere LDH-Konzentration  $778 \pm 98$  U/l.

Es werden keine signifikanten Veränderungen der Troponinwerte nach Gabe von Kogenate® in den Mäusen beobachtet und die Werte von ADAMTS13KO- und WT-Mäusen sind vergleichbar.

### 3.3.4 Gabe von Histonen

#### Gabe von 50 mg/kg Histonen

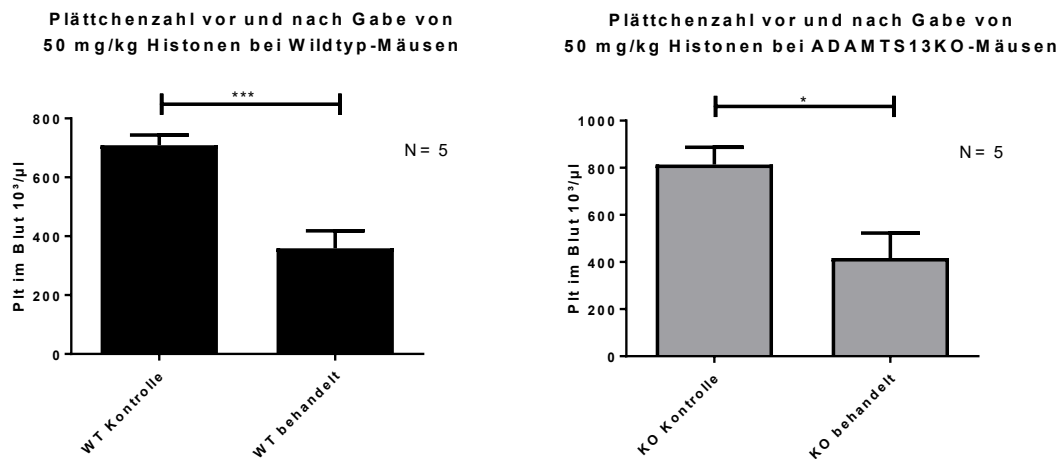


Abbildung 39: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl bei Gabe von 50 mg/kg Histonen betrug in den Wildtyp-Mäusen vor Behandlung  $709,2 \pm 34,39 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $359,2 \pm 59,41 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $813,4 \pm 73,73 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $417,4 \pm 105,7 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Der prozentuale Plättchenverbrauch betrug bei Wildtypen durchschnittlich 49,4 % und 48,7 % bei ADAMTS13KO-Mäusen und ist somit fast identisch.

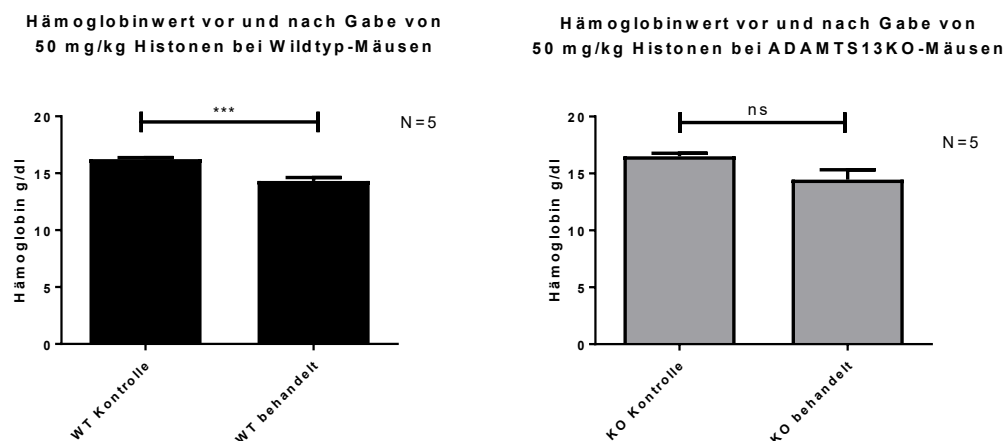


Abbildung 40: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 15 min nach Gabe von 50 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,24 \pm 0,1364$  g/dl und nach Behandlung  $14,32 \pm 0,3072$  g/dl und war signifikant. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,50 \pm 0,2683$  g/dl und nach Behandlung  $14,46 \pm 0,8571$  g/dl. Der Unterschied war nicht signifikant.

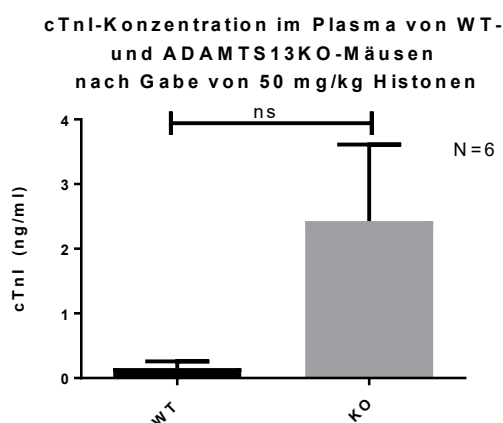


Abbildung 41: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug nach Injektion mit 50 mg/kg Histonen  $0,1550 \pm 0,1040$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $2,429 \pm 1,184$  ng/ml. Man erkennt zwar einen deutlichen Unterschied in den Werten, aufgrund der Streuung (siehe Limitation, Seite 87) sind die Werte im t-Test jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

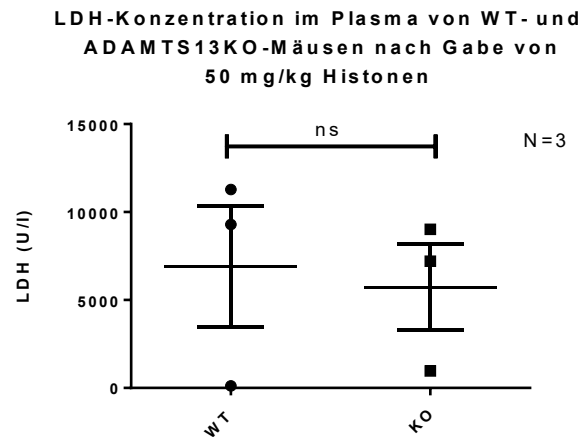


Abbildung 42: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg KG Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $6899 \pm 3437$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $5731 \pm 2439$  U/l. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

#### Gabe von 25 mg/kg Histonen

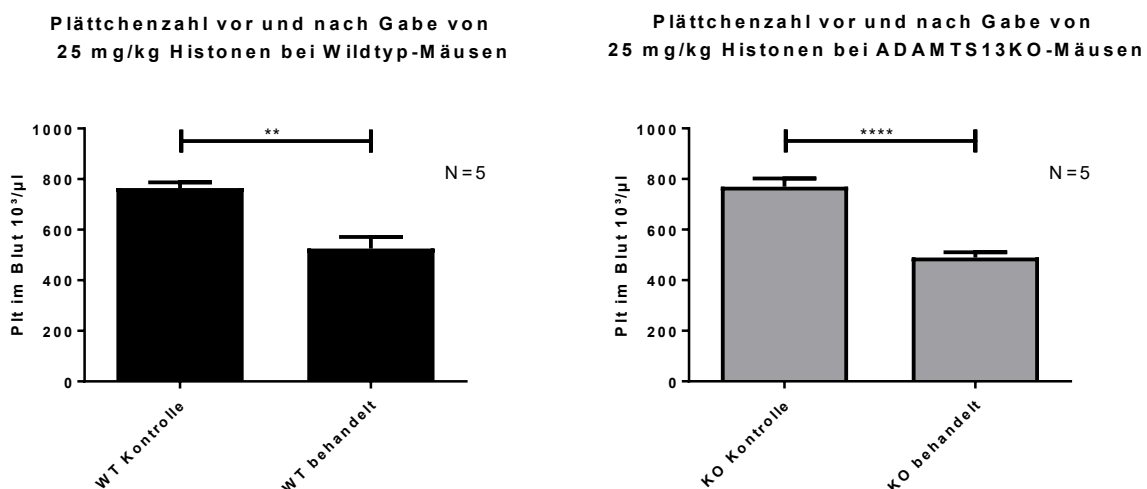


Abbildung 43: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 30 min nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Im Versuch mit 25 mg/kg Histonen betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $764,8 \pm 22,28 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $525,2 \pm 45,73 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 31%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $769,6 \pm 32,32 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $489,8 \pm 20,37 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 36%. Der Abfall ist in der AD-

AMTS13KO-Gruppe etwas größer größer als in der Wildtyp-Gruppe.

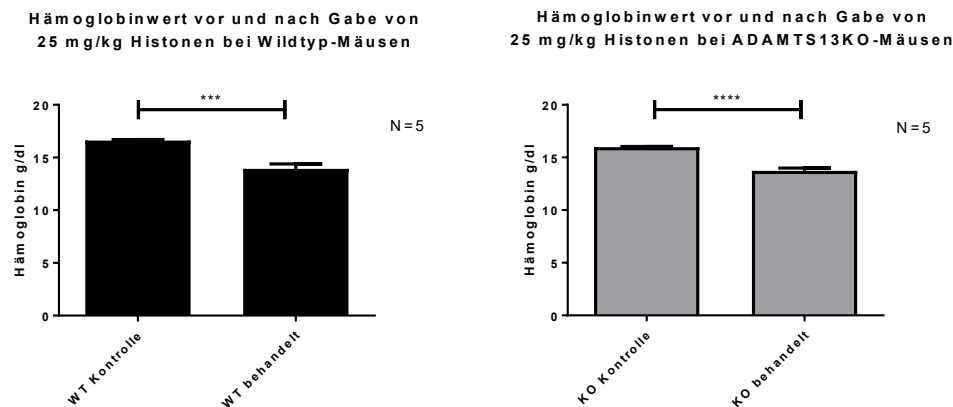


Abbildung 44: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 25 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,60 \pm 0,1140$  g/dl und nach Behandlung  $13,92 \pm 0,4727$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,98 \pm 0,06633$  g/dl und nach Behandlung  $13,72 \pm 0,2653$  g/dl.

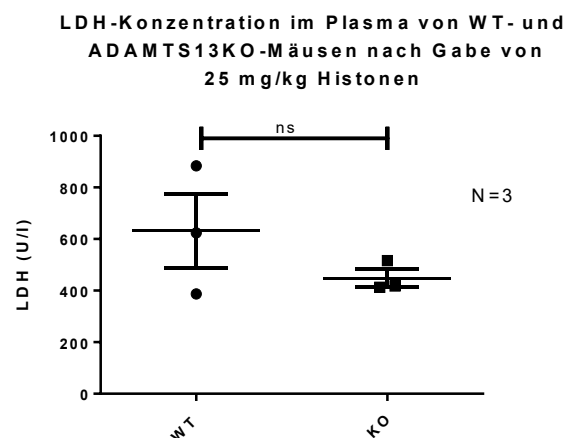


Abbildung 45: Vergleich der LDH-Konzentration zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $631,7 \pm 143,5$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der LDH-Gehalt  $449,0 \pm 33,53$  U/l. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

### Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF

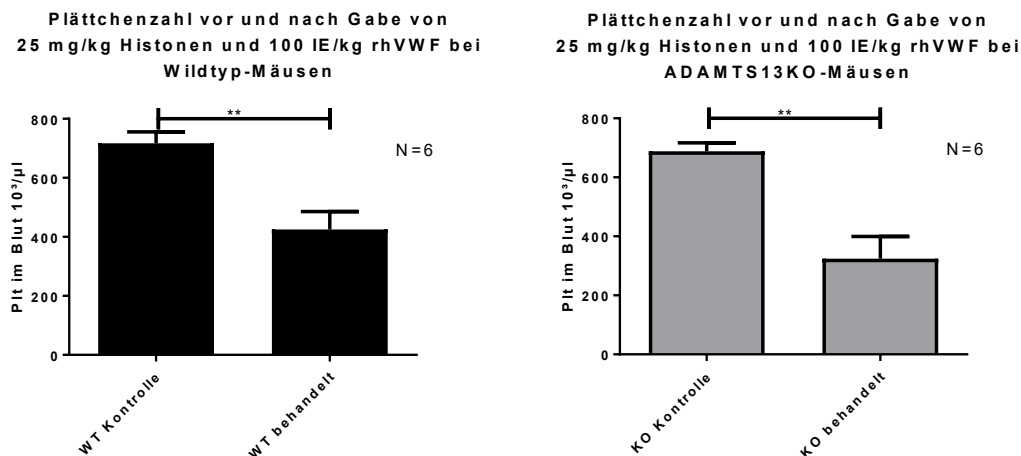


Abbildung 46: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen und 8 h nach 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Im Versuch “Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF“ betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $716,8 \pm 38,89 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $424,8 \pm 61,14 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 41%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $688 \pm 28,81 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $324 \pm 75,94 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 53%. Der Abfall ist in beiden Gruppen signifikant.

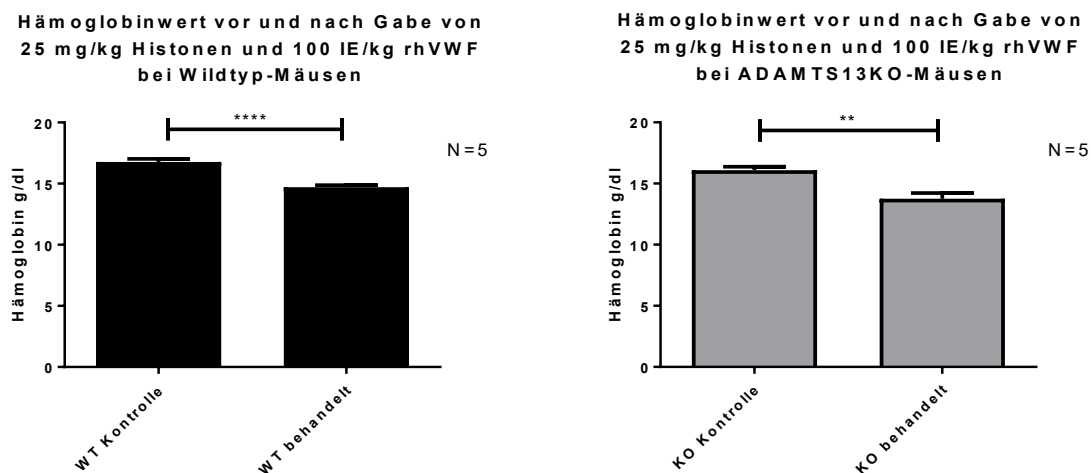


Abbildung 47: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 50 mg/kg Histonen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,78 \pm 0,2414$  g/dl und nach Behandlung  $14,7 \pm 0,1807$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,1 \pm 0,2733$  g/dl und nach Behandlung  $13,75 \pm 0,4815$  g/dl.

### 3.3.5 Gabe von LPS

#### Gabe von 2 mg/kg LPS

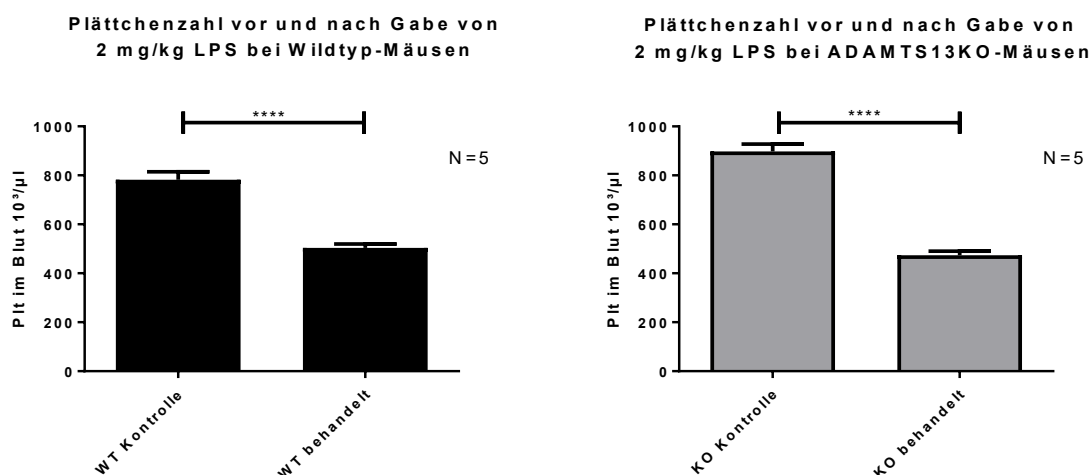


Abbildung 48: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor Versuchsbeginn und 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Im Versuch „Gabe von 2 mg/kg LPS“ betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $781,8 \pm 32,6 \times 10^3/\mu l$  und nach Behandlung  $503,8 \pm 15,56 \times 10^3/\mu l$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 35%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $898 \pm 29,67 \times 10^3/\mu l$  und nach Behandlung  $474 \pm 16,73 \times 10^3/\mu l$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 47%. In beiden Gruppen ist der Abfall stark signifikant. Bei der ADAMTS13KO-Gruppe ist ein stärkerer Abfall zu beobachten.

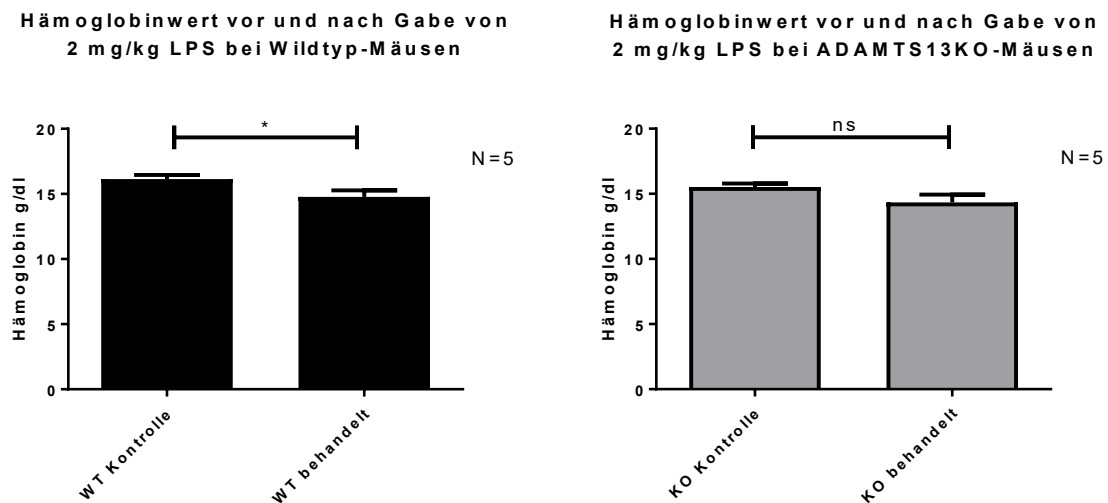


Abbildung 49: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.v. Injektion von 2 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,14 \pm 0,3187$  g/dl und nach Behandlung  $14,78 \pm 0,4903$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,52 \pm 0,2746$  g/dl und nach Behandlung  $14,34 \pm 0,5955$  g/dl. Es ist eine leichte Signifikanz in den Werten der Wildtyp-Gruppe zu beobachten.

Die gemessenen Troponinwerte (N=2) von diesem Versuch befindet sich in der Übersicht. Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,5885 \pm 0,3385$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,7235 \pm 0,7235$  ng/ml. Aufgrund der geringen Versuchsgruppe (N=2) konnte keine Aussage zur Signifikanz getroffen werden.

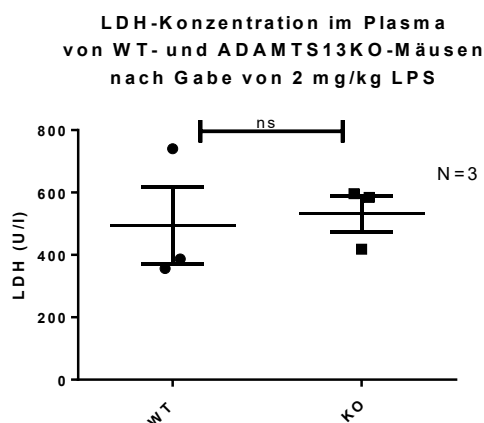


Abbildung 50: Vergleich der LDH-Konzentration bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $494,3 \pm 123,2$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $532,7 \pm 57,44$  U/l. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

### Gabe von 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF

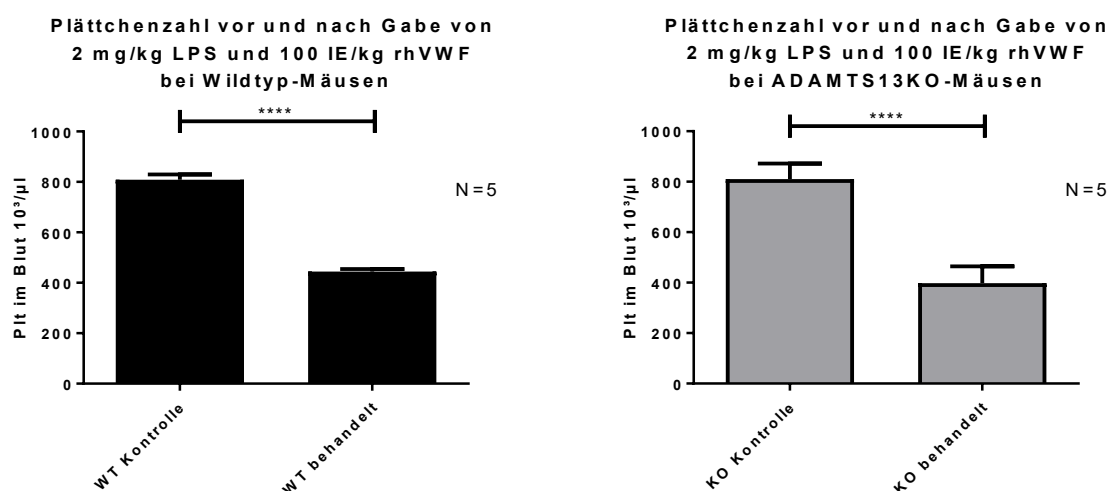


Abbildung 51: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS und 8 h nach zusätzlicher Gabe von 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Im Versuch mit 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF Gabe betrug die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse vor Behandlung  $809,0 \pm 20,31 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $444,4 \pm 10,32 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 45%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $810,8 \pm 61,03 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $398,2 \pm 66,67 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 51%. Der Plättchenabfall ist in beiden Gruppen stark signifikant.

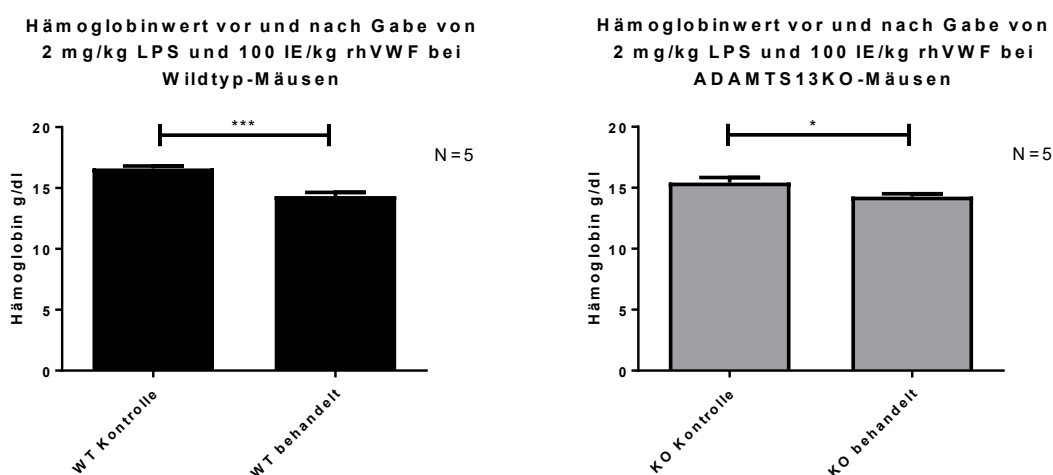


Abbildung 52: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach Gabe von 2 mg/kg LPS und insgesamt 8 h Gabe von 100 IU/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,60 \pm 0,2000$  g/dl und nach Behandlung  $14,34 \pm 0,2977$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,42 \pm 0,4259$  g/dl und nach Behandlung  $14,28 \pm 0,2311$  g/dl.

Die Messung von Troponin ist aufgrund der niedrigen Probengröße nicht repräsentativ (N=2) und daher nur der Vollständigkeit halber im Anhang aufgeführt. Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,4565 \pm 0,4365$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,5960 \pm 0,3360$  ng/ml.

#### Gabe von 1 mg/kg LPS

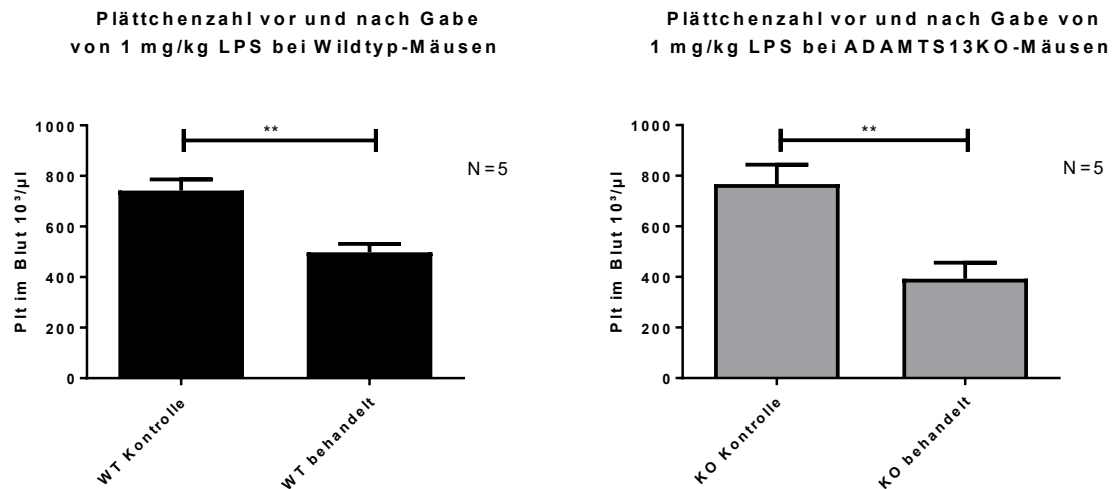


Abbildung 53: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $742,4 \pm 44,13 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung mit 1 mg/kg LPS  $497,8 \pm 33,50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 33%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $767,0 \pm 76,89 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung mit 1 mg/kg LPS  $393,0 \pm 63,15 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 49%. In beiden Gruppen ist der Abfall signifikant. In der ADAMTS13KO-Gruppe ist ein stärkerer Plättchenabfall zu erkennen.

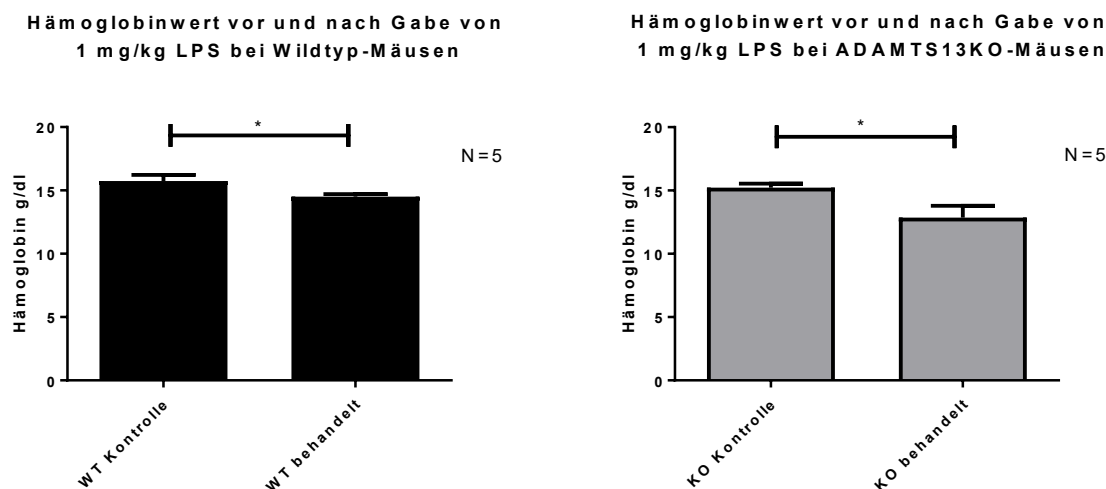


Abbildung 54: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach i.p. Injektion von 1 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $15,74 \pm 0,4854$  g/dl und nach Behandlung  $14,50 \pm 0,2049$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $15,22 \pm 0,3262$  g/dl und nach Behandlung  $12,86 \pm 0,9384$  g/dl. In beiden Gruppen ist der Abfall signifikant.

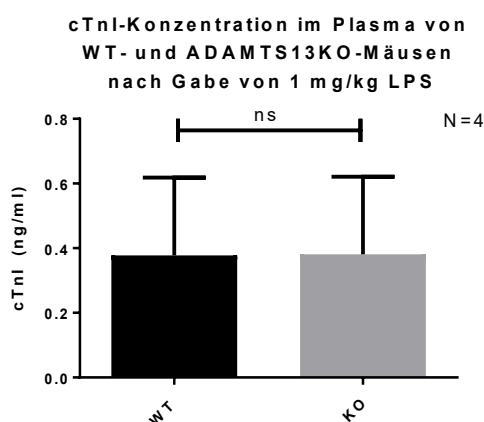


Abbildung 55: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) in Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,3780 \pm 0,2402$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,3813 \pm 0,2397$  ng/ml. Es ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die Werte sind in beiden Gruppen leicht erhöht.

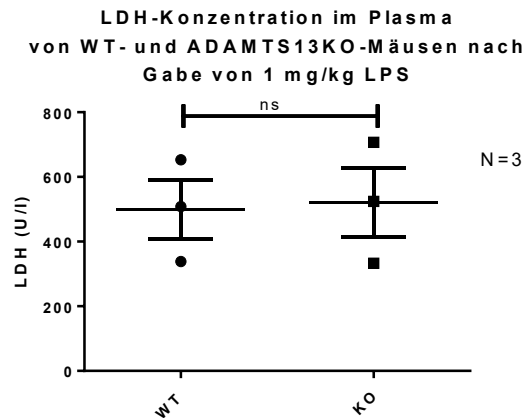


Abbildung 56: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $499,7 \pm 91,03$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $521,3 \pm 108,0$  U/l. Es ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

Es ist anzumerken, dass im „2 mg/kg LPS“ Versuch das LPS intravenös (i.v.) injiziert wurde, wohingegen in den Versuchen mit 1 mg/kg LPS, das LPS intraperitoneal (i.p.) injiziert wurde.

### 3.3.6 Gabe von Quensyl® (Hydroxychloroquin)

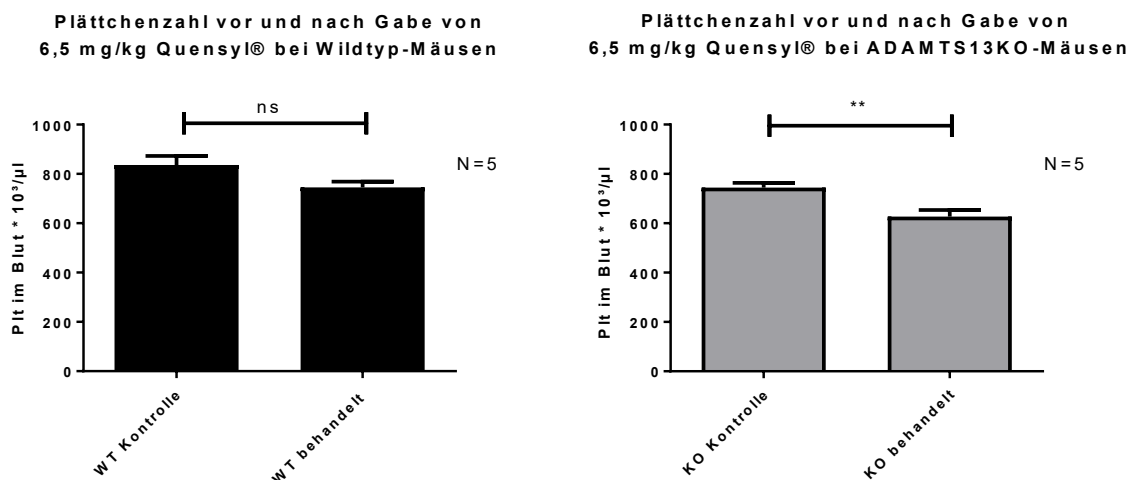


Abbildung 57: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung mit Quensyl®  $836,4 \pm 36,84 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $745 \pm 23,38 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 11%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung im Mittel  $744,2 \pm 19,23 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $626,8 \pm 26,72 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies ent-

spricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 16%. Wir sehen einen stärkeren Abfall in der ADAMTS13KO-Gruppe.

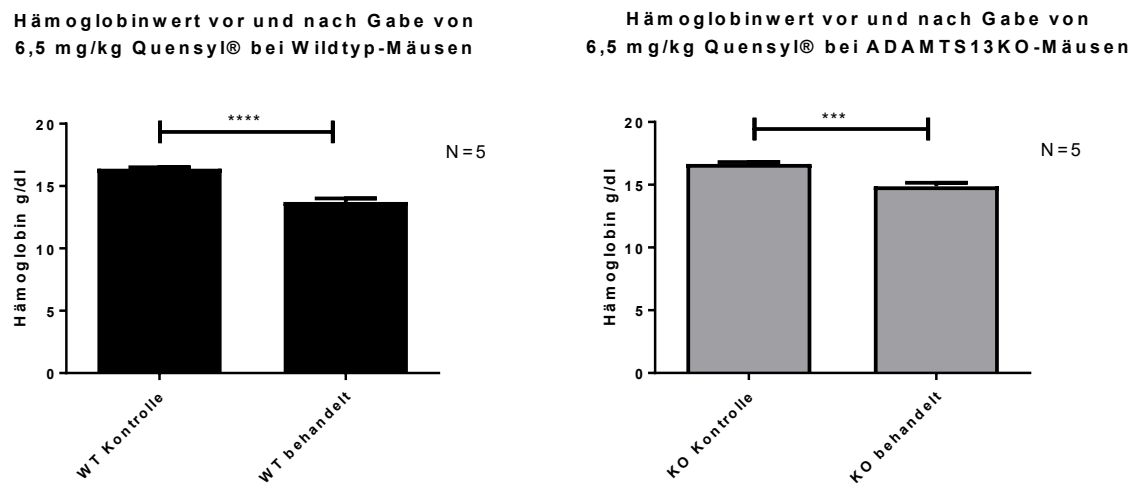


Abbildung 58: Vergleich des Hämoglobinwerts bei WT-Mäusen und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,54 \pm 0,1327$  g/dl und nach Behandlung  $13,88 \pm 0,2177$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,86 \pm 0,1887$  g/dl und nach Behandlung  $14,56 \pm 0,296$  g/dl.

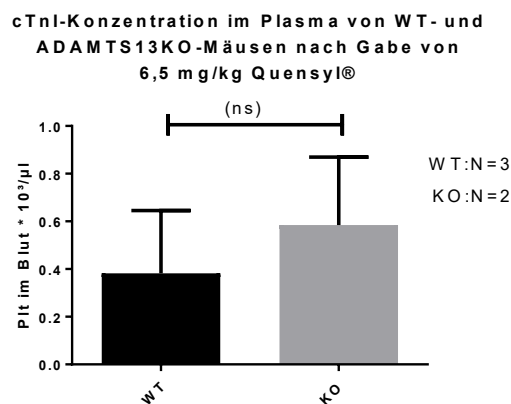


Abbildung 59: Vergleich der Konzentration von kardialen Troponin I (cTnI) zwischen Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,3823 \pm 0,2633$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,5850 \pm 0,2850$  ng/ml. Es ist keine Signifikanz zu erkennen. Die ADAMTS13KO-Mäuse zeigen etwas höhere Troponinwerte. (Die unterschiedliche N-Zahl ist durch eine Verwechslung der Proben entstanden, welche erst nach Abschluss der Versuche aufgefallen war und daher nicht wiederholt werden konnte).

LDH-Konzentration im Plasma von WT- und  
ADAMTS13KO-Mäusen  
nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl®

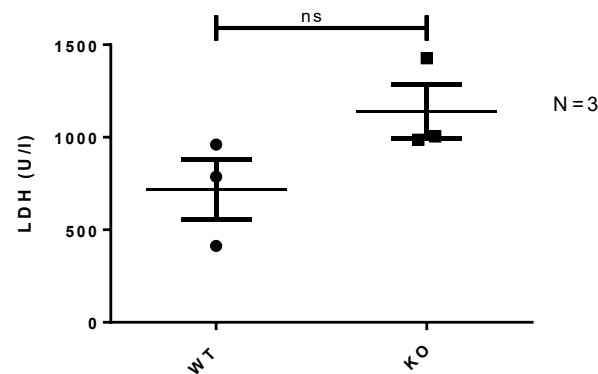


Abbildung 60: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl®  $720,0 \pm 161,4$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $1139 \pm 143,9$  U/l. Die Werte sind in beiden Gruppen erhöht. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu beobachten.

### 3.3.7 Gabe von Ticlopidin

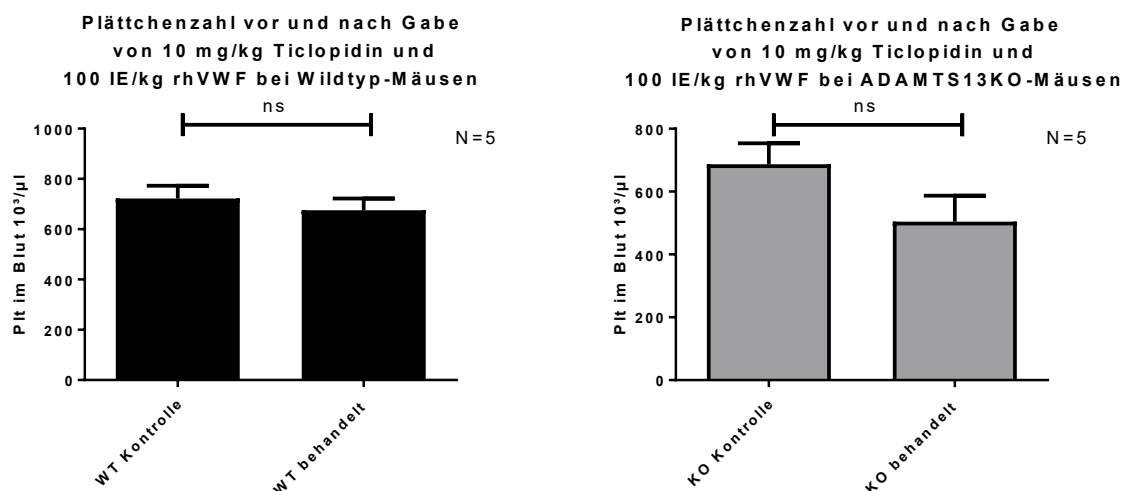


Abbildung 61: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 10 mg/kg Ticlopidin und Injektion von 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $722,0 \pm 51,07 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $675,6 \pm 46,71 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 6%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $687,2 \pm 66,62 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $504,0 \pm 82,82 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchen-

abfall von durchschnittlich 27%. Es ist ein höherer Abfall in der ADAMTS13KO-Gruppe zu erkennen. Statistisch ist der Abfall in beiden Gruppen nicht signifikant.

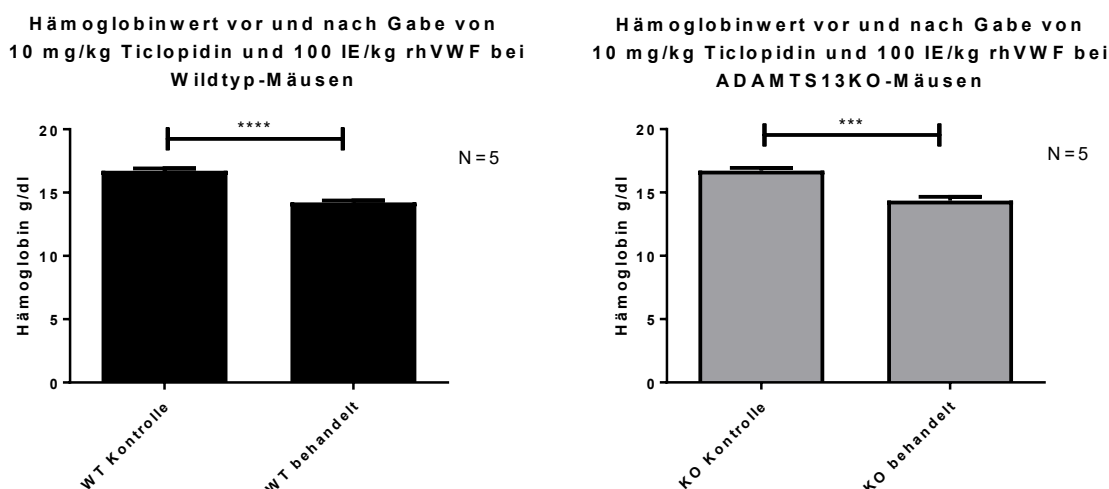


Abbildung 62: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO -Mäusen vor und nach Gabe von Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung mit Ticlopidin  $16,72 \pm 0,1934$  g/dl und nach Behandlung  $14,22 \pm 0,1625$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,72 \pm 0,2154$  g/dl und nach Behandlung  $14,36 \pm 0,3010$  g/dl.

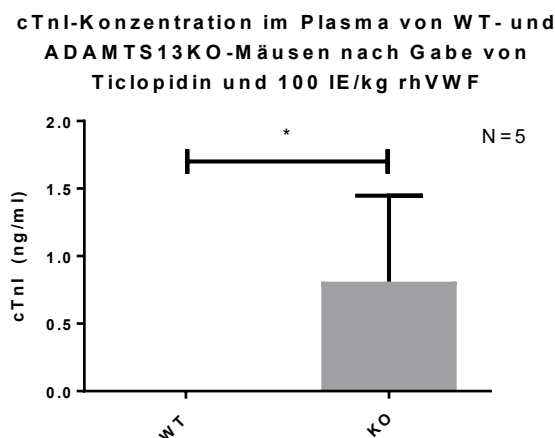


Abbildung 63: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,0 \pm 0,0$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,8102 \pm 0,2849$  ng/ml. Der Unterschied war signifikant.

LDH-Konzentration im Plasma von WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von 10 mg/kg Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF

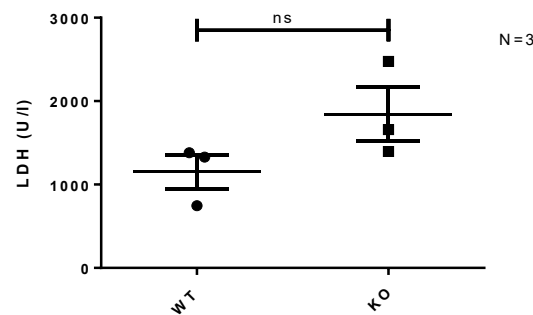
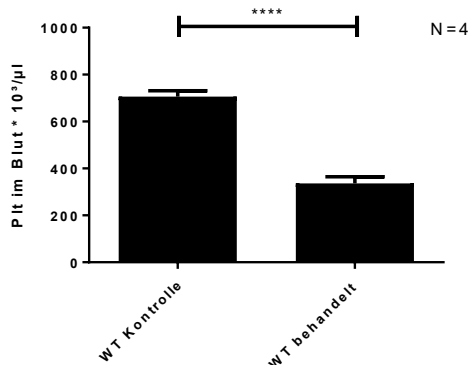


Abbildung 64: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von Ticlopidin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $1152 \pm 202,9$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $1843 \pm 325,2$  U/l. Die Werte sind in beiden Gruppen erhöht. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

### 3.3.8 Gabe von Gemcitabin

Plättchenzahl vor und nach Gabe von 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF bei Wildtyp-Mäusen



Plättchenzahl vor und nach Gabe von 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF bei ADAMTS13KO-Mäusen

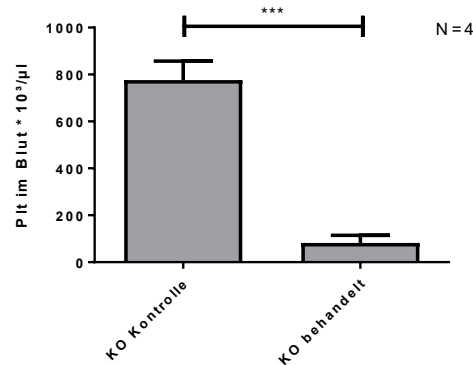


Abbildung 65: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Injektion mit 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF. „Kontrolle“ ist hier die Plättchenzahl der Gruppe 2 Tage vor Versuchsbeginn. „Behandelt“ zeigt die Plättchenzahl nach der 5-tägigen Versuchsreihe. Den Mäusen wurden über 5 Tage täglich i.p. Gemcitabin injiziert; am 5. Tag wurden den Mäusen zusätzlich 100 IE/kg rhVWF injiziert und 8 h später die Plättchenzahl gemessen. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung  $706 \pm 24,85 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung mit 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF  $336 \pm 28,42 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 52%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $776 \pm 81,25 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $81,75 \pm 32,45 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 89%. Trotz des

deutlich stärkeren Plättchenabfalls in der KO-Gruppe ist die Signifikanz aufgrund der Streuung niedriger als in der Wildtyp-Gruppe.

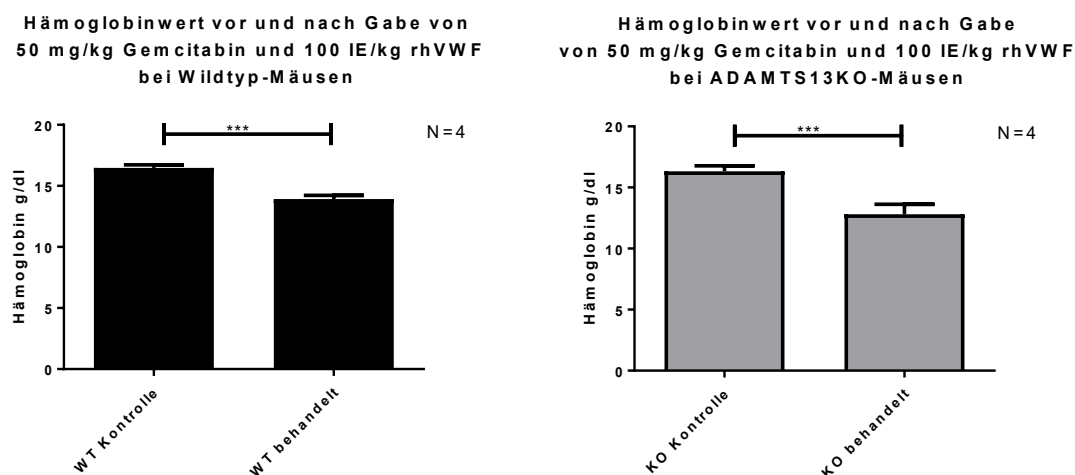


Abbildung 66: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF (s.o.). Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,48 \pm 0,2428$  g/dl und nach Behandlung  $13,93 \pm 0,2955$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,33 \pm 0,4460$  g/dl und nach Behandlung  $12,80 \pm 0,8317$  g/dl. Die Unterschiede sind in beiden Gruppen signifikant.

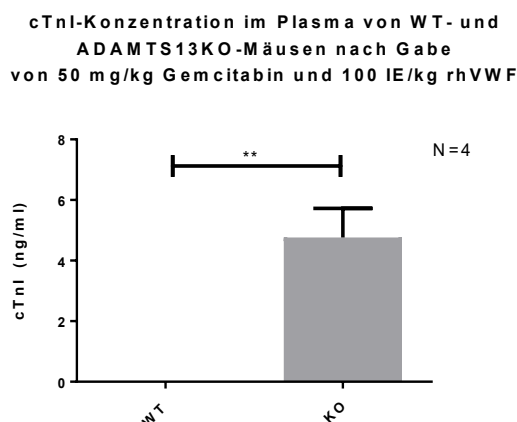


Abbildung 67: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF (s.o.). Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug nach Gabe von Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF  $0,09667 \pm 0,06114$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen war der Troponingehalt stark erhöht und betrug  $3,648 \pm 0,9373$  ng/ml. Der Unterschied zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen ist signifikant.

LDH-Konzentration im Plasma von  
WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe  
von 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF

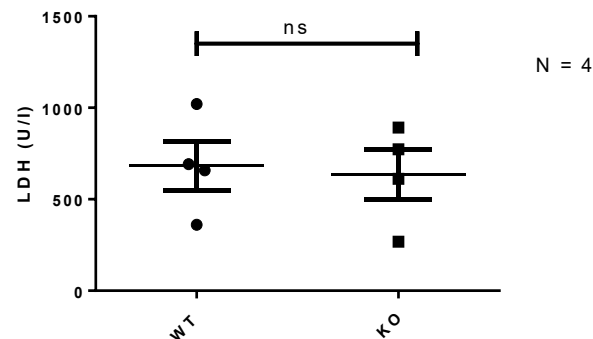
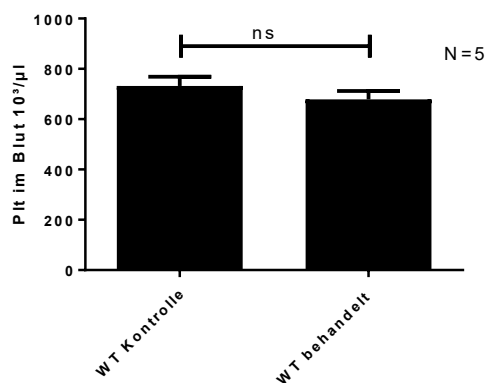


Abbildung 68: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach 5 tägiger Behandlung (s.o.). Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $682,5 \pm 135$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $636,3 \pm 135,5$  U/l. Die Werte sind im Vergleich zu den übrigen Versuchen nur leicht erhöht. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu beobachten.

### 3.3.9 Gabe von Mitomycin

Plättchenzahl vor und nach Gabe  
von 8 mg/kg Mitomycin bei Wildtyp-Mäusen



Plättchenzahl vor und nach Gabe  
von 8 mg/kg Mitomycin bei ADAMTS13KO-Mäusen

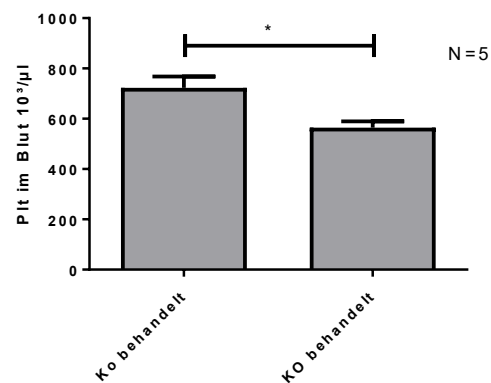


Abbildung 69: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 8 h nach Injektion mit 8 mg/kg Mitomycin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse betrug vor Behandlung mit 8 mg/kg Mitomycin  $732,0 \pm 36,45 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $679 \pm 33,19 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 7%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $723,2 \pm 44,36 \times 10^3/\mu\text{l}$  und nach Behandlung  $564,8 \pm 24,84 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Dies ent-

spricht einem Plättchenabfall von durchschnittlich 22%. Es ist ein signifikanter Unterschied bei den ADAMTS13KO-Mäusen zu beobachten.

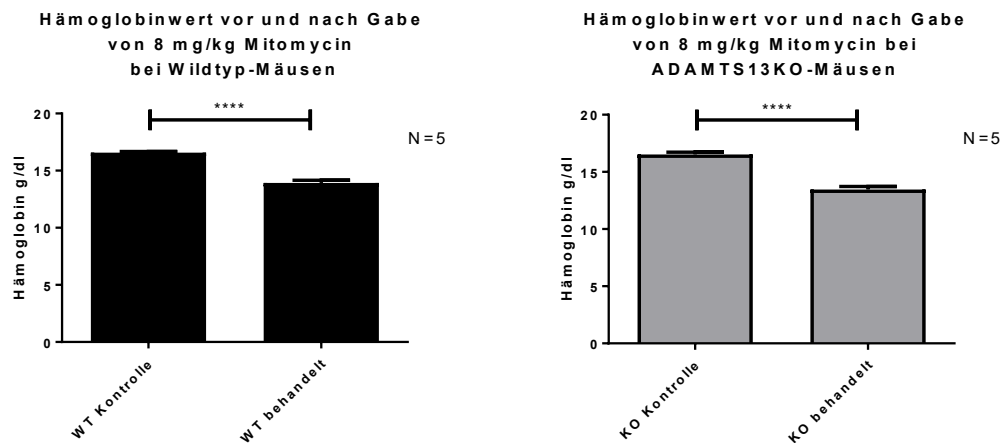


Abbildung 70: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Injektion mit 8 mg/kg Mitomycin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Bei den Wildtyp-Mäusen betrug der Hämoglobinwert vor Behandlung  $16,58 \pm 0,09695$  g/dl und nach Behandlung  $13,92 \pm 0,2417$  g/dl. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Wert vor Behandlung  $16,52 \pm 0,1985$  g/dl und nach Behandlung  $13,46 \pm 0,2657$  g/dl. Die Werte sanken in beiden Gruppen signifikant.

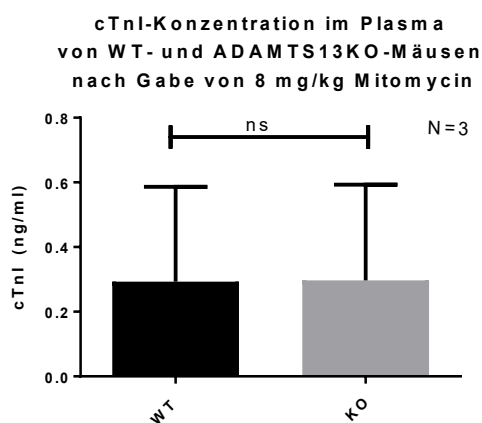


Abbildung 71: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit Mitomycin.

Der Troponingehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,2933 \pm 0,2933$  ng/ml. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug der Troponingehalt  $0,2967 \pm 0,2967$  ng/ml. Die Werte sind nur minimal erhöht. Es ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

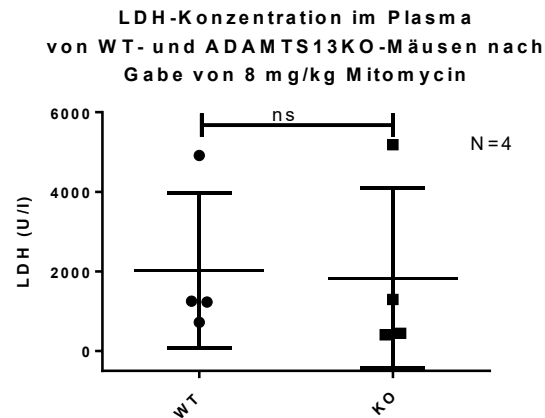


Abbildung 72: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Gabe von Mitomycin. Es wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt.

Die LDH-Konzentration der Wildtyp-Mäuse betrug  $2028 \pm 969,1$  U/l. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die LDH-Konzentration  $1833 \pm 1136$  U/l. Insgesamt, scheint Mitomycin eine Erhöhung der LDH-Werte zu bewirken, wobei 2 Tiere einen sehr hohen Wert aufweisen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Gruppe zu beobachten.

## 3.3.10 Übersicht der Ergebnisse

Tabelle 12: Übersicht der Versuchsergebnisse

| Versuch                               | Plättchenzahl (x 10 <sup>3</sup> /μl) mit SEM |               |          |               |               |          | Troponin (ng/ml)     |                        | LDH (U/l)            |                      |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|----------|---------------|---------------|----------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
|                                       | WT                                            |               |          | ADAMTS13KO    |               |          | WT                   | ADAMTS13KO             | WT                   | ADAMTS13KO           |
|                                       | vorher                                        | nachher       | % Abfall | vorher        | nachher       | % Abfall |                      |                        |                      |                      |
| 800 IE/kg rhVWF                       | 791,3 ± 46,51                                 | 544 ± 22,71   | 31%      | 827 ± 43,30   | 84 ± 26,55    | 90%      | 4,093 ± 3,773        | 15,32 ± 4,554          | 668,3 ± 326          | 3525 ± 478,5         |
| 500 IE/kg rhVWF                       | 782,7 ± 36,02                                 | 656,8 ± 37,88 | 16%      | 813,8 ± 43,69 | 173,7 ± 86,97 | 79%      | 0,160 ± 0,0851       | 9,250 ± 0,550          | 556,7 ± 168,4        | 2610 ± 447,1         |
| 250 IE/kg rhVWF                       | 721,5 ± 34,86                                 | 644,7 ± 40,92 | 11%      | 867,5 ± 72,54 | 207,5 ± 81,11 | 76%      | 0,1183 ± 0,0535      | 8,162 ± 2,902          | 1014 ± 678,7         | 737,0 ± 324,0        |
| 100 IE/kg rhVWF                       | 695,7 ± 44,66                                 | 596,0 ± 81,00 | 16%      | 742,3 ± 52,63 | 455,3 ± 64,55 | 39%      | 0,410 ± 0,3002       | 0,250 ± 0,220          | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen |
| 500 IE/kg Wilfactin                   | 710,8 ± 42,98                                 | 658,4 ± 45,19 | 7%       | 828,0 ± 38,69 | 764,6 ± 90,25 | 16%      | 0,0867 ± 0,0867      | 0,110 ± 0,110          | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen |
| 800 IE/kg Kogenate                    | 711,2 ± 41,09                                 | 624,8 ± 23,58 | 12%      | 871,6 ± 51,88 | 759,4 ± 71,71 | 13%      | 0,1667 ± 0,0851      | 0,1867 ± 0,0962        | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen |
| 50 mg/kg Histone                      | 709,2 ± 34,39                                 | 359,2 ± 59,41 | 49,00%   | 813,4 ± 73,73 | 417,4 ± 105,7 | 49%      | 0,155 ± 0,104        | 2,429 ± 1,184          | 6899 ± 3437          | 5731 ± 2439          |
| 25mg/kg Histone                       | 764,8 ± 22,28                                 | 525,2 ± 45,73 | 31%      | 769,6 ± 32,32 | 489,8 ± 20,37 | 36%      | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen   | 631,7 ± 143,5        | 449,0 ± 33,53        |
| 25 mg/kg Histone + 100 IE/kg rhVWF    | 716,8 ± 38,89                                 | 424,8 ± 61,14 | 41%      | 688 ± 28,81   | 324 ± 75,94   | 53%      | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen   | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen |
| 2 mg/kg LPS                           | 781,8 ± 32,6                                  | 503,8 ± 15,56 | 35%      | 898 ± 29,67   | 474 ± 16,73   | 47%      | 0,5885 ± 0,3385      | 0,7235 ± 0,7235 (N=2!) | 494,3 ± 123,2        | 532,7 ± 57,44        |
| 2 mg/kg LPS + 100 IE/kg rhVWF         | 809,0 ± 20,31                                 | 444,4 ± 10,32 | 45%      | 810,8 ± 61,03 | 398,2 ± 66,67 | 51%      | 0,4565 ± 0,4365      | 0,5960 ± 0,3360        | keine Werte gemessen | keine Werte gemessen |
| 1 mg/kg LPS                           | 742,4 ± 44,13                                 | 497,8 ± 33,50 | 33%      | 767,0 ± 76,89 | 393,0 ± 63,15 | 49%      | 0,3780 ± 0,2402      | 0,3813 ± 0,2397        | 499,7 ± 91,03        | 521,3 ± 108,0        |
| 6,5 mg/kg Quensyl                     | 836,4 ± 36,84                                 | 745 ± 23,38   | 11%      | 744,2 ± 19,23 | 626,8 ± 26,72 | 16%      | 0,3823 ± 0,2633      | 0,5850 ± 0,2850        | 720,0 ± 161,4        | 1139 ± 143,9         |
| 10 mg/kg Ticlopidin + 100 IE/kg rhVWF | 722,0 ± 51,07                                 | 675,6 ± 46,71 | 6%       | 687,2 ± 66,62 | 504,0 ± 82,82 | 27%      | 0,0 ± 0,0            | 0,8102 ± 0,2849        | 1152 ± 202,9         | 1843 ± 325,2         |
| 50 mg/kg Gemcitabin + 100 IE/kg rhVWF | 706 ± 24,85                                   | 336 ± 28,42   | 52%      | 776 ± 81,25   | 81,75 ± 32,45 | 89%      | 0,0967 ± 0,0611      | 3,648 ± 0,9373         | 682,5 ± 135          | 636,3 ± 135,5        |
| 8 mg/kg Mitomycin                     | 732,0 ± 36,45                                 | 679 ± 33,19   | 7%       | 723,2 ± 44,36 | 564,8 ± 24,84 | 22%      | 0,2933 ± 0,2933      | 0,2967 ± 0,2967        | 2028 ± 969,1         | 1833 ± 1136          |

### 3.4 Blutausstriche

Von jedem Versuch wurden HE-gefärbte Blutausstriche von mindestens 3 Mäusen pro Gruppe unter dem Mikroskop analysiert. Dargestellt sind Ausschnitte der Bilder, in denen Fragmentozyten zu sehen sind. Auf eine endgültige Quantifizierung der Fragmentozyten wurde verzichtet. Fragmentozyten wurden bei ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF, 250 IE/kg rhVWF, 25 mg/kg Histonen, 25 mg/kg Histonen mit 100 IE/kg rhVWF, 6,5 mg/kg Quensyl<sup>®</sup> und 50 mg/kg Gemcitabin gefunden. Im Folgenden sind Beispiele der Blutausstriche dargestellt.

#### Blutausstrich nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF

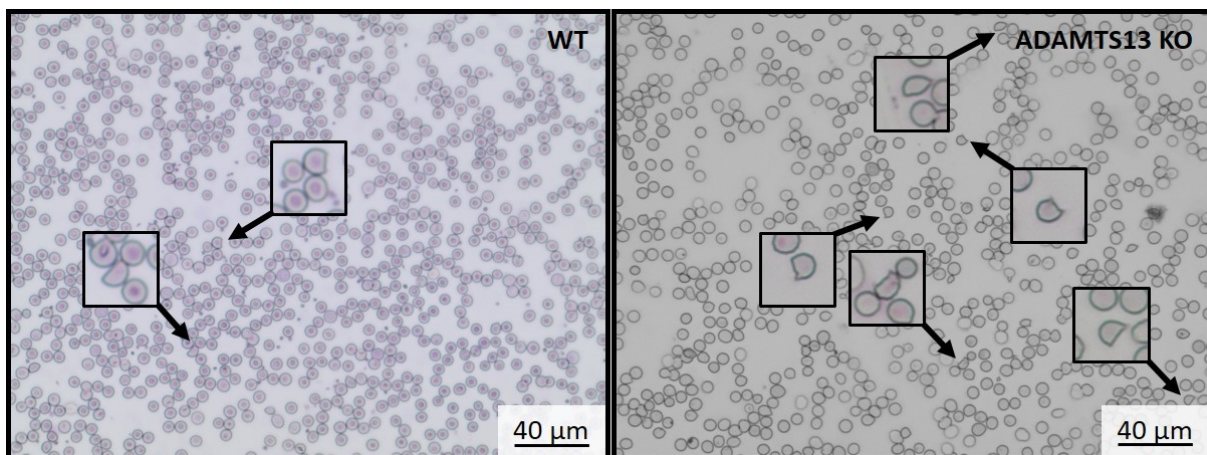


Abbildung 73: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 800 IE/rhVWF.

Nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF konnten sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen viele Fragmentozyten gefunden werden. Es wurden 0-2 Fragmentozyten bei Wildtyp-Mäusen und 0-5 bei ADAMTS13KO-Mäusen pro Objektträger gefunden. Die Zahl der Fragmentozyten war bei ADAMTS13KO-Mäusen im Vergleich insgesamt höher.

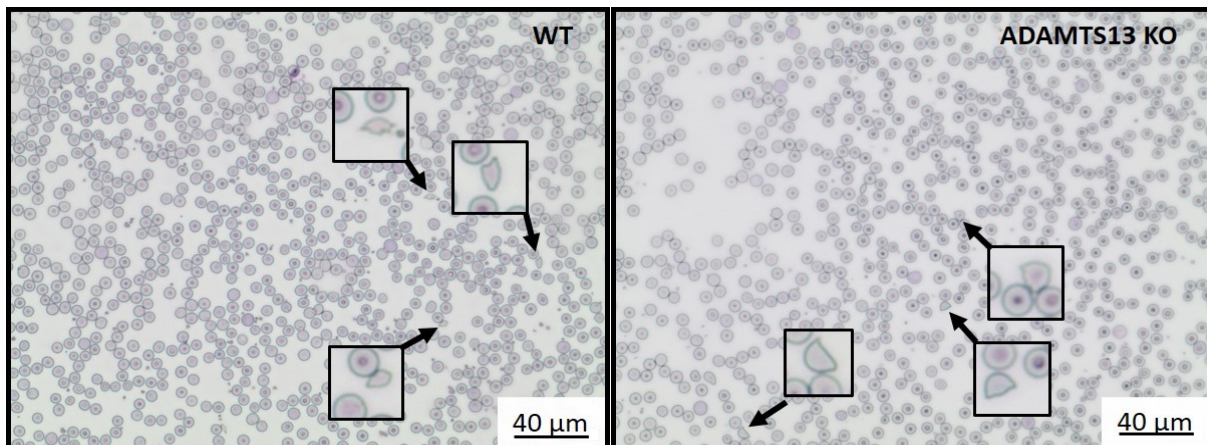
**Blutausstrich nach Gabe von 250 IE/kg rhVWF**

Abbildung 74: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF.

Nach Gabe von 250 IE/kg rhVWF wurden bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen pro Ausstrich 0-4 Fragmentozyten gefunden. Insgesamt waren mehr Fragmentozyten bei den ADAMTS13KO-Mäusen zu sehen.

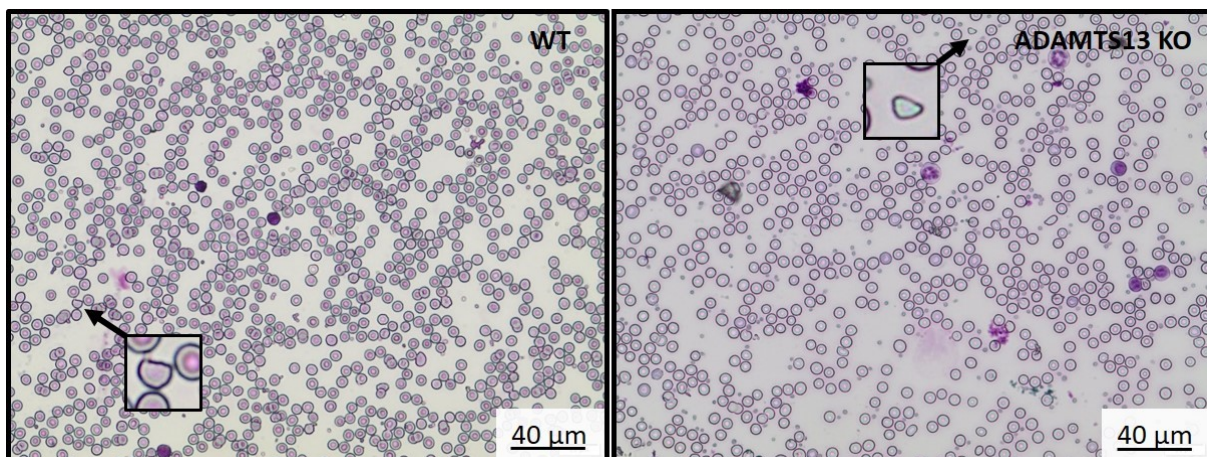
**Blutausstrich nach Gabe von 100 IE/kg rhVWF**

Abbildung 75: Blutausstriche von Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF.

Bei Sichtung im Mikroskop wurden nach Gabe von 100 IE/kg rhVWF im Durchschnitt 0-1 Fragmentozyten bei Wildtyp-Mäusen und 0-2 Fragmentozyten bei ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

### Blutausstrich nach Gabe von 25 mg/kg Histonen

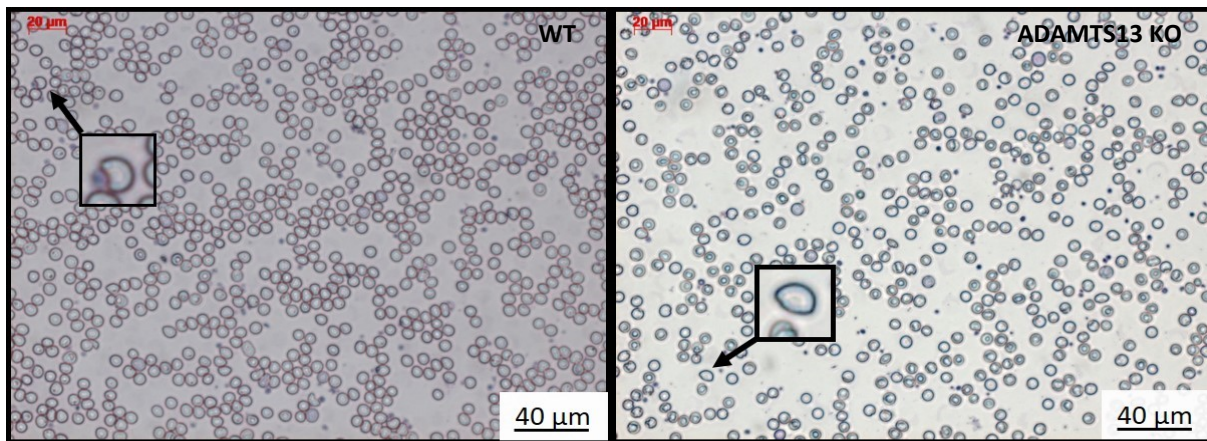


Abbildung 76: Blutausstriche von Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 25 mg/kg Histonen.

Nach Gabe von 25 mg/kg Histonen, wurden pro Ausstrich 0-5 Fragmentozyten bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

### Blutausstrich nach Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF

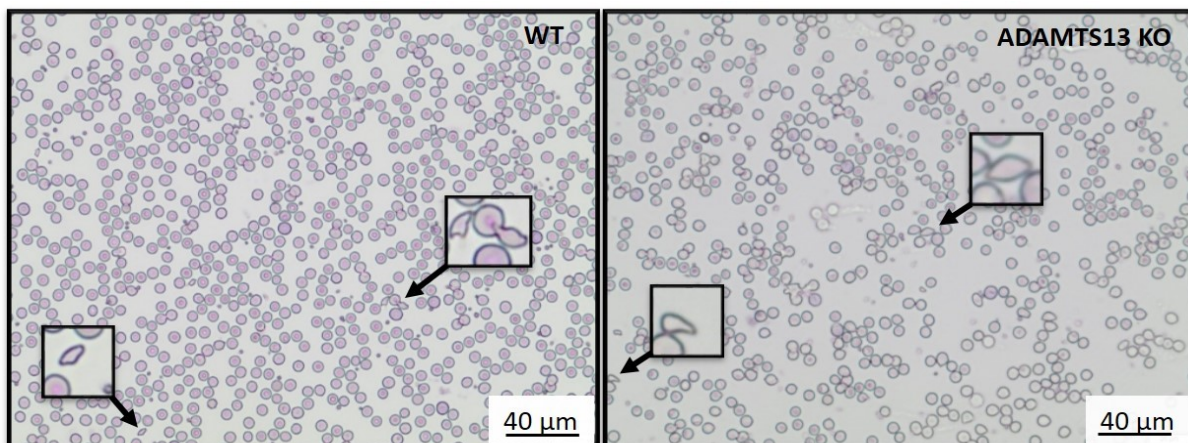


Abbildung 77: Blutausstriche von Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF

Im Versuch mit 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF wurden bei den Wildtyp-Mäusen 0-3 Fragmentozyten und bei ADAMTS13KO-Mäusen 0-5 Fragmentozyten gefunden.

### Blutausstrich nach Gabe von 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF

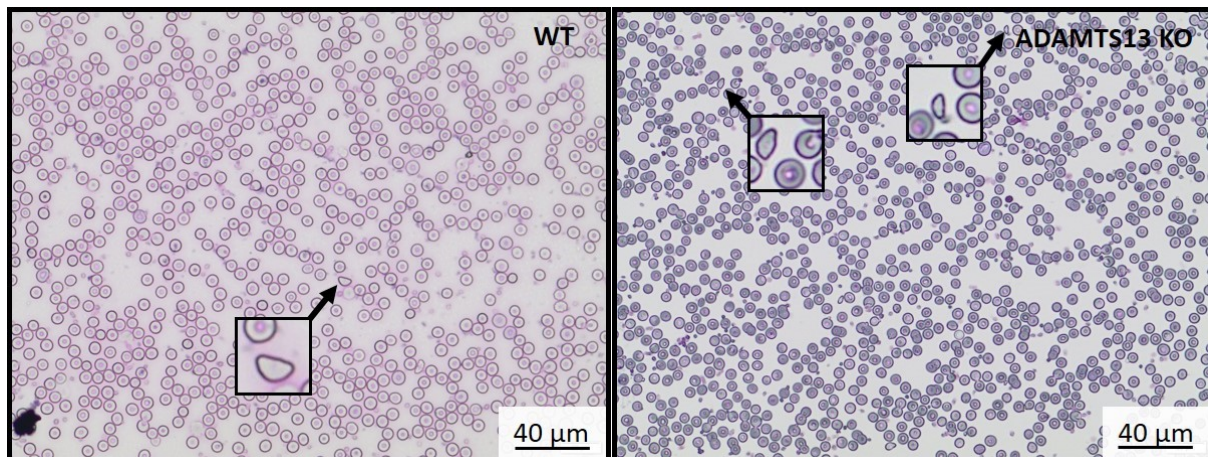


Abbildung 78: Blutaussstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF.

Bei den Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen wurden pro Blutbild (N=3) nach Gabe von 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF 0-2 Fragmentozyten gefunden. Die Zahl der Fragmentozyten war in beiden Gruppen vergleichbar groß.

### Blutausstrich nach Gabe von 1 mg/kg LPS

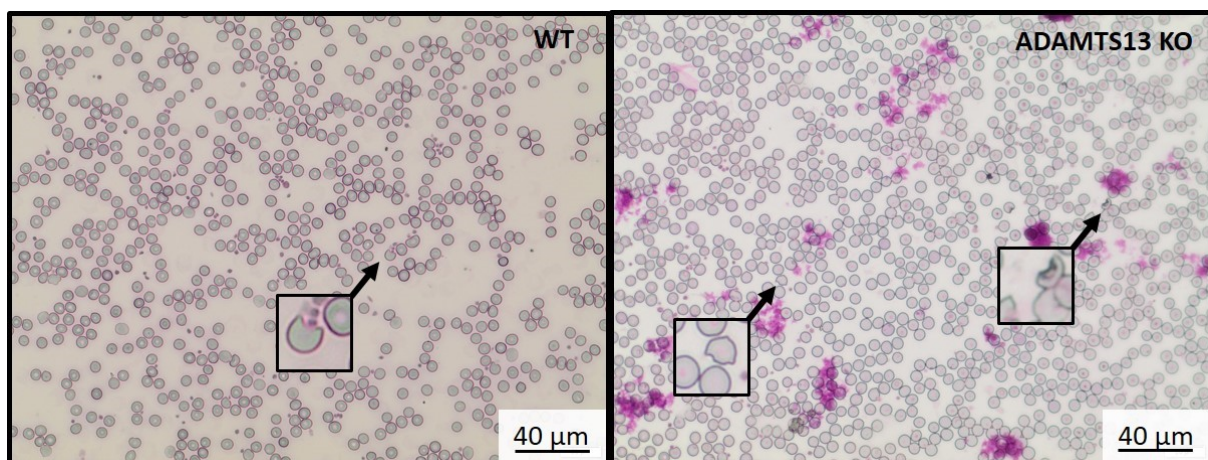


Abbildung 79: Blutaussstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 1 mg/kg LPS. Es wurden Fragmentozyten bei Wildtyp-Mäusen und ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

Nach Injektion mit 1 mg/kg LPS wurden 0-1 Fragmentozyten bei den Wildtyp-Mäusen gefunden. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen wurden 0- 6 Fragmentozyten entdeckt.

### Blutausstrich nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl®

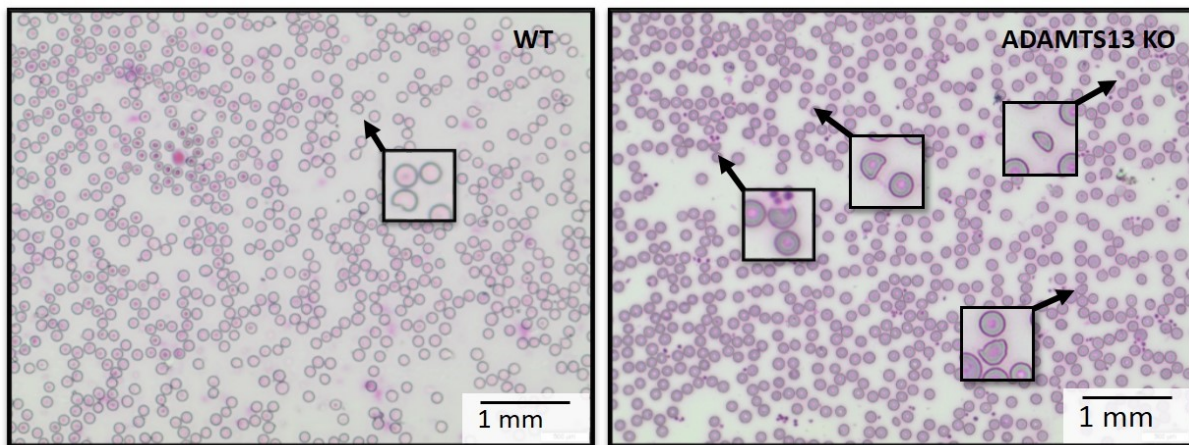


Abbildung 80: Blutausstriche von Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit Quensyl®.

Im Quensyl®-Versuch wurden pro Blutausstrich 0-1 Fragmentozyten bei Wildtyp-Mäusen und 0-4 Fragmentozyten bei den ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

### Blutausstrich nach Gabe von Gemcitabin

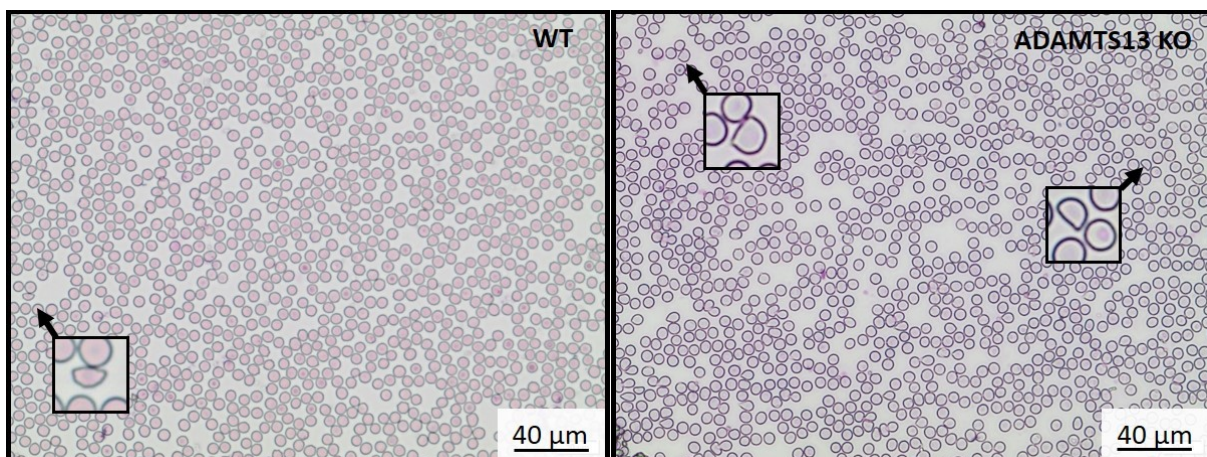


Abbildung 81: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit Gemcitabin.

Nach Gabe mit Gemcitabin wurden 0-2 Fragmentozyten bei Wildtyp-Mäusen und 0-8 Fragmentozyten bei ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

### 3.5 Einflussfaktoren auf die Plättchenzahl der Maus

Abhängigkeit zwischen Plättchenzahl, Gewicht, Geschlecht und Alter bei Wildtyp und ADAMTS13KO-Mäusen

#### Abhängigkeit von Plättchenzahl und Alter der Mäuse

Für unsere Versuche verglichen wir zusätzlich den Zusammenhang zwischen Alter, Gewicht, Geschlecht und der Plättchenzahl, um auszuschliessen, dass diese Faktoren die Ergebnisse der Arbeit signifikant verfälschen. Es zeigte sich, dass ältere Mäuse tendenziell eine höhere Zahl an Plättchen besaßen als jüngere Mäuse. Außerdem besaßen die ADAMTS13KO-Mäuse in unseren Versuchen eine höhere Plättchenzahl als die Wildtyp-Mäuse.

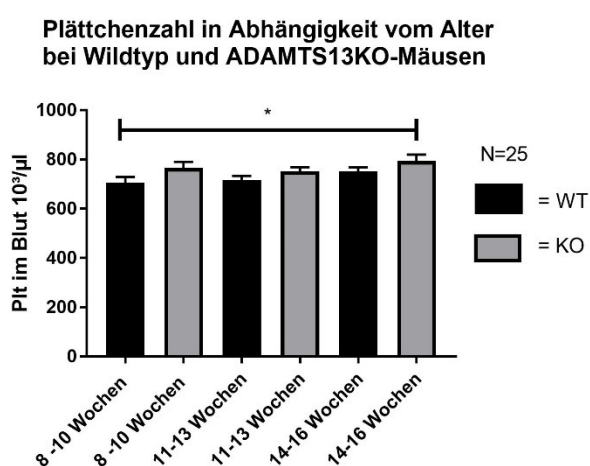


Abbildung 82: Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen in Abhängigkeit vom Alter. Es wurde der „Multiple comparison test“ nach Tukey durchgeführt. (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\*\* =  $p < 0,001$ ). Es gab einen signifikanten Unterschied in der Plättchenzahl zwischen 8-10 Wochen alten Wildtypen und 14-16 Wochen alten ADAMTS13KO-Mäusen.

Wie man in Abbildung 82 erkennt, steigt die Plättchenzahl mit dem Alter. Insgesamt ist die Plättchenzahl in den ADAMTS13KO-Mäusen höher. Ob die stets höhere Plättchenzahl in ADAMTS13KO-Mäusen mit dem Knockout des Gens zusammenhängt oder sich in Folge der Inzucht entwickelt hat, ist unklar. Das Alter der Versuchstiere war in der Regel zwischen 8 und 16 Wochen, wobei in den einzelnen Versuchen darauf geachtet wurde, dass Alter und Geschlecht bei beiden Versuchsgruppen vergleichbar gewählt waren.

#### Abhängigkeit von Plättchenzahl und Gewicht der Mäuse

Mäuse mit einem höheren Gewicht, die gleichzeitig meist älter sind, besaßen in den Versuchen eine höhere Zahl an Plättchen als Mäuse mit einem geringeren Gewicht.

**Plättchenzahl in Abhängigkeit vom Gewicht (g)  
bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen**

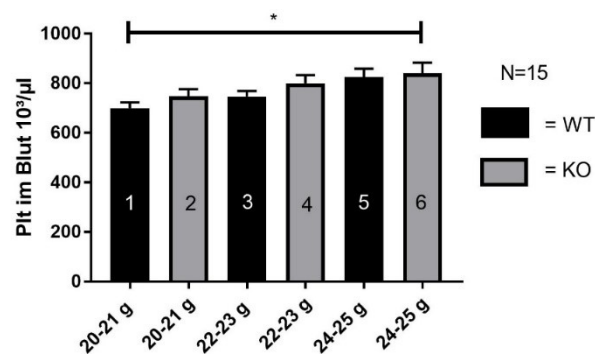


Abbildung 83: Abgebildet ist die Plättchenzahl in Abhängigkeit vom Gewicht der Maus. (Multiple comparison Test, Tukey) Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 6 wurde ein signifikanter Unterschied errechnet. (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\*\* =  $p < 0,001$ )

Es wurden sowohl Männchen als auch Weibchen einbezogen und je 15 Mäuse pro Gruppe gewählt, dafür wurden die Tiere randomisiert. Da die Test-Gruppen, was Geschlecht und Alter angeht, in den Versuchen stets vergleichbar gewählt wurden, zeigen diese Ergebnisse, dass eine weitere Untersuchung nicht wichtig ist. Vergleicht man die unterschiedlichen Gewichtsklassen der Wildtyp- und ADAMTS13KO-Männchen untereinander und stellt sie in ein Verhältnis mit der entsprechenden Plättchenzahl, erkennt man mit steigendem Gewicht auch eine steigende Zahl an Plättchen. Das gleiche gilt für die ADAMTS13KO-Mäuse. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtypen mit einem Gewicht von 20-21g und den ADAMTS13KO-Mäusen mit einem Gewicht von 24-25g. Geys et al. veröffentlichten bei der ISTH 2015 ein Poster, welches darauf schließen lässt, dass Adipositas bei ADAMTS13-defizienten Mäusen ein Risikofaktor für die Entwicklung einer TTP ist (Geys et al., 2015).

#### Abhängigkeit von Plättchenzahl und Geschlecht

In den Versuchen wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Aufgrund der physiologischen Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Säugetieren, ist es wichtig in unseren Versuchen geschlechterspezifische bzw. gewichts- oder altersspezifische Reaktionen auf Trigger, welche das Ergebnis verfälschen könnten, auszuschließen. Liu et al. berichteten von einer geschlechtsabhängigen Hochregulierung der Protease ADAMTS13 in Mäusen (Liu et al., 2012). Bei Menschen sind insbesondere schwangere Frauen mit angeborener TTP gefährdet, einen TTP-Schub zu entwickeln. Das Endothel sezerniert während der Schwangerschaft unter anderem vermehrt VWF. Unser Mausmodell entspricht Menschen mit angeborener TTP.

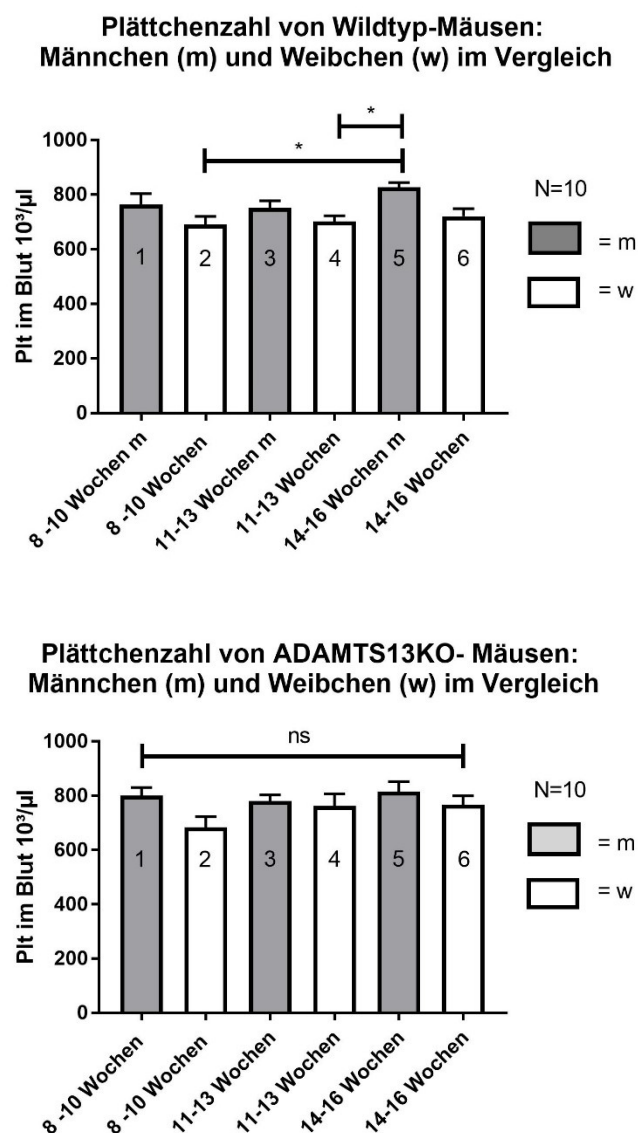


Abbildung 84: Vergleich der Plättchenzahl von weiblichen und männlichen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen. Die Signifikanz wurde mit dem „Multiple comparison test“ nach Tukey berechnet.

Zwischen Männchen und Weibchen der ADAMTS13KO-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied gefunden. Bei den Wildtyp-Mäusen gab es eine Signifikanz zwischen 8-10 Wochen alten Weibchen und 14-16 Wochen alten Männchen sowie 11-13 Wochen alten Weibchen und 14-16 Wochen alten Männchen.

### 3.6 Limitationen

Die LDH-Werte unterlagen teilweise großen Schwankungen. Das Plasma musste für die Messung teils stark verdünnt werden, da das Gerät zur Messung von menschlichen Proben gedacht war und ein dementsprechend hohes Volumen benötigt wurde. Dennoch waren die

LDH-Werte bei ADAMTS13KO-Mäusen tendenziell höher. Das Plasma wurde für unsere Versuche möglicherweise zu häufig aufgetaut und zu stark verdünnt, was zu Schwankungen beigetragen haben könnte. Um große Schwankungen in der Messung zu unterbinden, sollten zukünftige LDH-Messungen mit einem größeren Volumen an frischem Plasma wiederholt werden. Zusätzlich ist zu bedenken, dass es durch die Blutentnahme ebenfalls zu einer Hämolyse kommen kann. Parallel zum LDH-Wert könnte man eventuell auch den Haptoglobinwert messen. Ein niedriger Haptoglobinwert zeigt einen erhöhten Abbau von Erythrozyten an.

Allgemein fallen bei den Troponinwerten in einigen Versuchen große Schwankungen der Werte innerhalb einer Gruppe auf. Dies könnte man, wie Benhamou et al., auf Ungenauigkeiten bei der Messung zurückführen: Benhamou et al. berichten von vereinzelt Messschwierigkeiten und gehen von einer cTnI-Degradierung aufgrund der Gefrier- und Tauzyklen aus (Benhamou et al., 2015). Ein anderer Grund könnte aber damit zusammenhängen, dass die Bildung und der Ort eines Thrombus einem gewissen Zufall unterliegen. Bei Mäusen in denen sich ein Thrombus im Herzen bildet, findet man erhöhte Troponinwerte. Mäuse, welche keinen Thrombus im Herzen bilden, haben dementsprechend keine erhöhten Troponinwerte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Maus als Modell für den Menschen

Mäuse werden schon lange und erfolgreich zur Untersuchung der Hämostase und Thrombose als Modell für den Menschen verwendet. Da in dieser Arbeit eine menschliche Krankheit in einem Mausmodell getestet wurde, ist es wichtig, auf Unterschiede im Blutsystem zwischen Mensch und Maus aufmerksam zu machen und diese in Hinblick auf die Übertragbarkeit für den Menschen kritisch zu erörtern.

Die offensichtlichen Unterschiede bestehen in der Größe und dem Gewicht. Wiegt ein Mensch im Durchschnitt 62 kg (Walpole et al., 2012), so wiegt eine Maus zwischen 18 und 40 g. Durch die im Verhältnis größere Oberfläche der Maus ist ein erhöhter Wärmeverlust gegeben, der durch einen schnelleren Stoffwechsel kompensiert werden muss. Daraus resultiert eine erhöhte Herzfrequenz. Die Herzfrequenz bei Mäusen beträgt, abhängig vom Stamm, zwischen 594 und 665 Schlägen pro Minute (Mattson, 2001). Der Blutdruck beträgt je nach Mausstamm zwischen 122/102 mmHg. Im Menschen dagegen beträgt der Blutdruck idealerweise 120/80 mmHg, die Herzfrequenz 50-80 Schläge pro Minute.

In einer Studie von Windberger et al. wurden unter anderem die Erythrozytenaggregation und die Viskosität im Blut von Säugern verglichen (Windberger et al., 2003). Die Viskosität des Mausblutes ist niedriger als die Viskosität von Menschenblut. Je geringer die Fließgeschwindigkeit, desto größer ist der Unterschied zwischen Maus und Mensch in der Viskosität.

Die niedrige Viskosität des Mausblutes könnte einer von mehreren Gründen sein, dass Mäuse eine vergleichsweise hohe Zahl an VWF-Einheiten vertragen ohne lebensbedrohliche Thromben zu bilden.

Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse zusätzlich eine sehr viel höhere Zahl an zirkulierenden Plättchen (Jackson et al., 1990; Levin & Ebbe, 1994). Die Plättchen der Mäuse sind etwas kleiner als die der Menschen ( $4,7 \pm 0,3$  fl bei der Maus, 7,5-10 fl beim Menschen) (Corash & Levin, 1990). In Maus-Plättchen werden außerdem die Rezeptoren PAR 3 und 4 exprimiert (Sambrano et al., 2001), beim Menschen hingegen PAR 1 und PAR 4. Dieses deutet auf Unterschiede in der Thrombin-Signalisierung bei Menschen und Mäusen hin (Ishihara et al., 1997; Nakanishi-Matsui et al., 2000). Die Ultrastruktur der Plättchen und Megakaryozyten ist bei Mensch und Maus ähnlich, die Lebensdauer der zirkulierenden Plättchen ist bei Mäusen etwa halb so lang (3-4 Tage), wie die der Menschen (Ault & Knowles, 1995; Schmitt et al., 2001). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Mensch und Maus liegt in der im

Blut vorhandenen VWF-Konzentration. Menschen besitzen eine VWF-Konzentration von 0,4 bis 2,4 IE/ml Blut (Laffan et al., 2014), die der hier verwendeten Mäusen lag zwischen 0,3 und 0,4 IE/ml (Ebner, 2015). Es gibt also wichtige Faktoren im Blutsystem der Maus, welche sich vom Menschen stark unterscheiden. Dieser Tatsache muss man sich bei der Auswertung der Ergebnisse und der Übertragbarkeit auf dem Menschen bewusst sein.

Hogan et al. analysierten die Maus als Modell der Hämostase, indem sie Arbeiten verglichen, in denen Mäuse mit unterschiedlichen Knockouts von Genen hämostatisch wichtiger Proteine untersucht wurden. Bei den Mäusen handelte es sich um Tiere, denen Proteine fehlten, die beispielsweise für die Thrombinaktivierung oder für die Gerinnungsbildung wichtig sind. Sie verglichen die Auswirkungen dieser Knockout-Mäuse mit entsprechenden menschlichen Krankheitsbildern (insofern vorhanden) und kamen zu dem Schluss, dass man das Modell der Maus für die Hämostase im Menschen trotz einiger Unterschiede gut verwenden kann (Hogan et al., 2002). Interessant ist die Beschreibung von Knockout-Mäusen, welche trotz nicht vorhandener Plättchen größtenteils überlebten und fertil waren (Shivdasani et al., 1995), was in Menschen nicht möglich wäre.

Tabelle 13: Vergleich Plättchen und Megakaryozyten bei Mensch und Maus modifiziert aus Schmitt et. al 2001

| Mittlere Zahl                          | Mensch  | Maus (n= 6) |
|----------------------------------------|---------|-------------|
| Plättchenzahl ( $\times 10^9$ /l Blut) | 150–400 | 1000–1500   |
| Plättchendurchmesser ( $\mu\text{m}$ ) | 1–2     | 0.5         |
| Plättchenvolumen (fl)                  | 8–9     | 3–4         |
| Plättchenlebensdauer (Tage)            | 8–12    | 3–4         |

## 4.2 Titration mit rhVWF

**Bereits eine Dosis von 100 IE/kg rhVWF bewirkt signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen.**

Die Gabe von rhVWF erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Schiviz et al. (Schiviz et al., 2012). Durch die Gabe sollte überprüft werden, ob der Knockout des ADAMTS13-Gens in Mäusen einen prothrombotischen Zustand, beziehungsweise eine vergleichbare Reaktion wie in Patienten der hereditären TTP bewirkt. In der Arbeit von Schiviz wurden bereits ADAMTS13-Knockout-Mäuse getestet; es handelte sich dabei um C57BL/6 Mäuse. Dieser Stamm hat eine vergleichbar niedrige Konzentration an VWF im Plasma (Schiviz et al.,

2012). Da bekannt ist, dass jeder Mausstamm spezifische physiologische Eigenschaften mit sich bringt, beispielsweise kann die VWF-Konzentrationen, abhängig vom Mausstamm, um das 20-fache erhöht sein (Mohlke et al., 1996), war es für die Arbeit wichtig, die Wirkung von rhVWF in unseren 129S2/SvPasCrl Mäusen zu testen. K. Ebner hatte in ihrer Doktorarbeit (Ebner, 2015), bereits gezeigt, dass die Injektion von 2000 IE/kg rhVWF in den 129S2/SvPasCrl Mäusen einen starken Plättchenverbrauch bewirkt. Eine Gabe von 2000 IE/kg rhVWF ist jedoch vergleichbar hoch und sowohl Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäuse wiesen einen extrem hohen Verbrauch von Plättchen auf. Von Willebrand Patienten, welche VWF zu therapeutischen Zwecken verabreicht bekommen, werden in der Regel mit 40-80 IE/kg behandelt (Sadler & Lillicrap, 2013), was die hohe Menge der in die Mäuse injizierten VWF Einheiten verdeutlicht. Durch die Titration sollte jene Schwellendosis an rhVWF gefunden werden, die bei ADAMTS13KO-Mäusen, nicht aber bei Wildtyp-Mäusen, einen signifikanten Plättchenverbrauch bewirkt. Ein Abfall der Plättchen ist bei TTP-Patienten immer ein Hinweis auf einen Plättchenverbrauch durch Bildung von Thromben. Es wurden Dosen von 800 IE/kg, 500 IE/kg, 250 IE/kg und 100 IE/kg rhVWF verabreicht. In allen diesen Versuchen konnte ein Plättchenverbrauch beobachtet werden. Die untere Schwelle zeigte sich bei Gabe von 100 IE/kg rhVWF. Eine Gabe von 100 IE/kg rhVWF bewirkte bei den ADAMTS13KO-Mäusen einen kleinen jedoch signifikanten Plättchenverbrauch (39% Abfall; Abfall von  $742,3 \pm 52,63 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $455,3 \pm 64,55 \times 10^3/\mu\text{l}$  Plättchen). Im Gegensatz hierzu, konnte bei den Wildtyp-Mäusen bei einer Gabe von 100 IE/kg rhVWF keine signifikante Veränderung der Plättchenzahl beobachtet werden. Geht man von einem Blutvolumen von 7-8% des Körpergewichts aus, erhöht sich der VWF-Spiegel bei Gabe von 100 IE/kg rhVWF in den Mäusen um etwa 1,25 IE/ml, was der 3 bis 4-fachen Menge des physiologischen VWF-Spiegels entspricht. Mäuse des 129S2/SvPasCrl Stamms vertragen, zumindest über einen kurzen Zeitraum, die 3 bis 4-fache Menge an zusätzlichem VWF ohne messbaren Schaden zu erleiden. Man kann davon ausgehen, dass Symptome, die sich in den Mäusen zeigen, im Menschen stärker ausgeprägt wären, beziehungsweise schon nach geringeren Dosen zum Vorschein kämen.

Die Hämoglobinwerte sanken nach Gabe von rhVWF in beiden Gruppen geringfügig; in den Wildtyp-Mäusen jedoch stärker als bei den ADAMTS13KO-Mäusen. Die Messung des Hämoglobins ist bei TTP-Patienten ein wichtiger sekundärer Indikator und wird bei Verdacht auf TTP stets durchgeführt. Die Hämoglobinwerte gaben in unseren Versuchen keinen Aufschluss über einen prothrombotischen Zustand in ADAMTS13KO-Mäusen. Dies lässt sich damit erklären, dass der Hämoglobinabfall bei der TTP erst zu einem späteren Zeitpunkt auftritt, der erste und signifikanteste Indikator für eine TTP bleibt der Plättchenverbrauch. Ein signifikan-

ter Abfall der Hämoglobinwerte bei den ADAMTS13KO-Mäusen wäre daher wahrscheinlich erst nach längerer Zeit beobachtet worden.

Die Troponinwerte waren bei Gabe von 800 IE/kg, 500 IE/kg und 250 IE/kg rhVWF in den ADAMTS13KO-Mäusen signifikant erhöht. Nach einer Gabe von 100 IE/kg rhVWF wurde keine signifikante Erhöhung des Troponinwerts gegenüber den Wildtyp-Mäusen errechnet. Eine Gabe von 100 IE/kg rhVWF ist daher auch am Troponinwert gemessen als Schwellendosis gut geeignet.

Die LDH-Werte zeigten bei Gabe von 800 IE/kg und 500 IE/kg rhVWF signifikante Erhöhungen in den ADAMTS13KO-Mäusen. Im Versuch mit 250 IE/kg rhVWF war der Unterschied nicht mehr signifikant, infolgedessen wurde auch keine LDH-Messung für den Versuch mit 100 IE/kg rhVWF durchgeführt.

Der Grund des erhöhten Plättchenverbrauchs bei Gabe von zusätzlichem VWF ist durch die Bildung von Mikrothrombosen zu erklären. Die zusätzliche Menge an VWF im Plasma kann ab einer gewissen Konzentration selbst bei Wildtyp-Mäusen möglicherweise nicht schnell genug gespalten werden. In Folge sammeln sich große wachsende VWF-Multimer Geflechte an der Gefäßwand und es werden vermehrt Plättchen abgefangen und Thromben gebildet. Das verwendete rekombinante humane VWF-Substrat besitzt UL-VWF. UL-VWF-Multimere zeigen eine höhere Aktivität (Turecek et al., 2009). Sie gelten als prothrombotisch: Plättchen, Leukozyten und parasitenbefallene Thrombozyten bleiben leichter an ihnen haften (De Ceunynck et al., 2012). Bei Tieren mit einem Knockout der ADAMTS13-Protease führt eine zusätzliche Gabe von VWF erwartungsgemäß zu größeren Auswirkungen hinsichtlich der Hämostase. Schon geringere Dosen von VWF sind ausreichend, um bei ADAMTS13KO-Mäusen einen Plättchenverbrauch zu bewirken. Die Tatsache, dass das Blut der Mäuse unter anderem eine niedrigere Viskosität hat, könnte erklären, warum eine im Menschen vergleichsweise hohe Gabe von VWF in den ADAMTS13KO-Mäusen zu keinem TTP-Schub führt. Eine andere Möglichkeit wäre zum Beispiel, dass in den Mäusen zusätzlich unbekannte Faktoren zu einem raschen Abbau des VWFs beitragen.

#### 4.3 Die Gabe von humanem plasmatischen VWF bei Mäusen

##### **Plasmatischer VWF ist weniger aktiv als rekombinanter VWF.**

Nach Gabe von 500 IE/kg Wilfactin (humanem plasmatischem VWF) wurde weder bei den Wildtyp- noch bei den ADAMTS13KO-Mäusen ein signifikanter Plättchenabfall beobachtet. Das Hämoglobin sank bei den ADAMTS13KO-Mäusen signifikant im Gegensatz zu den

Wildtyp-Mäusen. Die LDH-Werte waren bei Wildtyp-Mäusen höher als bei den ADAMTS13KO-Mäusen; insgesamt waren die Werte jedoch niedrig. Die Troponinwerte waren nicht erhöht. Wilfactin, das plasmatische VWF-Konzentrat, zeigte nicht die gleiche Auswirkung wie die vergleichbare Menge an rekombinantem humanen VWF. Eine Konzentration von 500 IE/kg rhVWF bewirkte im Gegensatz zu Wilfactin sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen einen starken Plättchenverbrauch und einen signifikanten Anstieg der Troponin- und LDH-Werte. Diese Ergebnisse bestätigen die früheren Untersuchungen von Ebner (Ebner, 2015), welche selbst bei sehr hoher Gabe von Wilfactin (2000 IE/kg) keine Auswirkungen in ADAMTS13KO-Mäusen beobachtete.

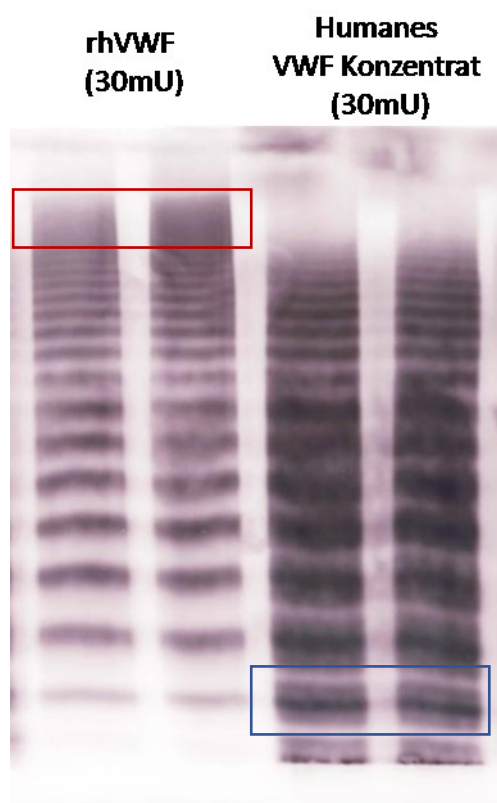


Abbildung 85: Gelelektrophoretische Auftrennung des VWFs im Multimergelelektrophorese-Experiment aus Ebner (Ebner, 2015). Abgebildet ist auf der linken Seite des Gels rekombinanter humaner VWF und rechts Wilfactin (humanes plasmatisches VWF Konzentrat). Man erkennt deutlich, dass UL-VWF-Multimere nur im rekombinanten VWF vorkommen (roter Kasten). Rechts im humanen VWF-Konzentrat sieht man die typische Triplettsstruktur des VWF (blauer Kasten), die nach der Spaltung durch ADAMTS13 entsteht.

Wilfactin wird aus dem humanen Plasma aufgereinigt, es hat einen geringen Gehalt an Faktor VIII und sehr wenige bis keine UL-VWF-Multimere (siehe Abbildung 85). Im Gegensatz zu anderen plasmatischen VWF-Präparaten wurden bei Wilfactin zusätzlich virale Inaktivierungs- und Eliminierungsschritte durchgeführt, um das Risiko einer Krankheitsübertragung über Plasma zu verringern (Mazurier et al., 2004). Pharmakokinetische Tests zeigten, dass

diese Schritte weder das Konzentrationsmaximum noch die Bioverfügbarkeit des plasmatischen VWFs im VWF:Ag- und VWF:RCo-Test signifikant veränderten (Goudemand et al., 2005). Wilfactin stabilisiert im Gegensatz zu anderen plasmatischen VWF-Präparaten den endogenen FVIII, wodurch der FVIII Gehalt nur langsam steigt und sich nach einigen Stunden normalisiert (Goudemand et al., 2005). Pharmakokinetische Untersuchungen zu rekombinanten VWF ergaben, dass rekombinanter VWF eine höhere Aktivität erreichte als plasmatischer VWF, was auf die großen von ADAMTS13 ungeschnittenen UL-VWF Multimere zurückzuführen ist. In Bezug auf den Faktor VIII wurden keine Einschränkungen in rekombinanten VWF beobachtet. Rekombinanter VWF stabilisiert wie auch Wilfactin den Faktor VIII im Körper (Turecek et al., 2009). Der Unterschied in der Wirkung von 500 IE/kg rhVWF und 500 IE/kg Wilfactin scheint daher in erster Linie mit dem Fehlen von UL-VWF-Multimeren im Wilfactin zusammenzuhängen. Möglich ist, dass plasmatischer VWF durch vorherige Prozessierung im Körper einfacher und schneller abgebaut werden kann als rekombinanter VWF, was die längere Halbwertszeit von rekombinantem VWF ebenfalls belegt (Turecek et al., 2009).

#### 4.4 Die Gabe von Faktor VIII bei ADAMTS13KO-Mäusen

##### **Die zusätzliche Gabe von 800 IE/kg Faktor VIII zeigt keinen Einfluss auf ADAMTS13KO-Mäuse.**

Die Gabe von Faktor VIII sollte zeigen, ob Faktor VIII einen Einfluss auf die TTP beziehungsweise auf den VWF und ADAMTS13 hat.

Es konnte gezeigt werden, dass der Gerinnungsfaktor VIII in Form von Kogenate® keinen signifikanten Plättchenverbrauch bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen bewirkte. Bei den Wildtyp-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $711,2 \pm 41,09 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $624,8 \pm 23,58 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 12%. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen betrug die Plättchenzahl vor Behandlung  $871,6 \pm 51,88 \times 10^3 / \mu\text{l}$  und nach Behandlung  $759,4 \pm 71,71 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Dies entspricht einem Abfall von durchschnittlich 13%. Dieser geringe Verbrauch an Plättchen kommt wahrscheinlich schon alleine durch die Blutabnahme und Messschwankungen zustande. Die Troponinwerte waren nicht erhöht und im Blutaussstrich waren keine auffälligen Mengen an Fragmentozyten zu erkennen. Die Hämoglobinwerte hingegen sanken signifikant bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen ab. Die LDH-Werte waren etwas erhöht, aber nicht signifikant ver-

schieden, die Gruppengröße für die LDH-Messung war jedoch nicht groß genug um haltbare Aussagen zu treffen (N=2).

In der Literatur wird diskutiert, dass eine erhöhte Faktor VIII Konzentration im Blut (unabhängig von VWF) die Ursache für eine verstärkte Thromboseneigung ist (Kyaw et al., 2016; Patole & Ramya, 2015). Chang et al. beobachteten bei Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall eine Erhöhung der Faktor VIII Konzentration im Plasma (Chang et al., 2014). Unklar ist jedoch, ob dies lediglich auf die Eigenschaft des Faktor VIII als Akute-Phase-Protein zurückzuführen ist. Shamsavarzadeh et al. argumentierten, dass eine erhöhte Konzentration von Faktor VIII ein 10-fach höheres Risiko für eine Sinusvenenthrombose sein könnte (Shamsavarzadeh et al., 2011). Menschen erhalten typischerweise zur Behandlung zwischen 25 und 50 IE/kg Faktor VIII (Manco-Johnson et al., 2007). Mit der Gabe von 800 IE/kg Faktor VIII wurden den Mäusen eine vergleichsweise hohe Gabe an Faktor VIII gegeben, trotzdem wurden im Versuch keine Nebenwirkungen beobachtet. Dumont et al. testeten sogar die Gabe von 1000 IE/kg eines rekombinanten FVIII-Fusionsproteins bei Ratten und konnten keine nachteiligen Auswirkungen bei diesen beobachten (Dumont et al., 2015). Die Gabe von 800 IE/kg FVIII bewirkte in unserem Versuch weder in ADAMTS13KO- noch in Wildtyp-Mäusen eine signifikante Veränderung im Plättchenverbrauch und den Troponinwerten, wir können daher davon ausgehen, dass eine ADAMTS13-Defizienz in Verbindung mit einem erhöhten Faktor VIII Spiegel keine Hyperkoagulation bewirkt und das Faktor VIII keinen großen Einfluss auf die TTP hat.

## 4.5 Die Rolle von Entzündungen bei der TTP am Beispiel von Histonen und LPS

### 4.5.1 Die Auswirkungen von ADAMTS13-Defizienz bei Gabe von Histonen

**ADAMTS13KO-Mäuse scheinen kurze Zeit nach Gabe von Histonen unwesentlich empfindlicher auf Histone zu reagieren als Wildtyp-Mäuse.**

Die verschiedenen Werte waren bei ADAMTS13KO- und Wildtyp-Mäusen etwa 20 Minuten nach Gabe von Histonen nicht signifikant unterschiedlich.

Da Histone in Verbindung mit Infektionen, Entzündungen und Thrombosen auftreten (Ramanjaneyulu Allam, et al., 2014; Ammollo et al., 2011), liegt es nahe, dass sie Einfluss auf die Pathophysiologie der TTP haben könnten. Aus diesem Grund war es für unseren Versuch interessant, die Auswirkung von Histonen in Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen miteinander zu vergleichen. Etwa 20 Minuten nach Gabe von 50 mg/kg Histonen war der Verbrauch an Plättchen bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vergleichbar hoch, wenn

auch die Signifikanz des Verbrauchs in den Wildtypen höher war, was mit der starken Streuung der Werte in der ADAMTS13KO-Gruppe zusammenhing. Der durchschnittliche Abfall der Plättchenzahl betrug in beiden Gruppen etwa 49%.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Troponinwerten der Wildtyp- und der ADAMTS13KO-Gruppe (Troponingehalt bei Wildtyp:  $0,1550 \pm 0,1040$  ng/ml; bei ADAMTS13KO:  $2,429 \pm 1,184$ ). In der ADAMTS13KO-Gruppe gab es aber Tiere, die einen relativ hohen Troponinwert (über 3,1 ng/ml in 2 Mäusen) aufwiesen und daher Anzeichen für eine Schädigung im Herzmuskel bzw. mögliche Mikrothrombosen hatten. Die LDH-Werte waren in beiden Gruppen auffällig hoch.

Bei Gabe von 25 mg/kg Histone war ebenfalls ein signifikanter Abfall der Plättchenzahl zu beobachten; die Signifikanz war bei den ADAMTS13KO-Mäusen höher als in den Wildtyp-Mäusen. Prozentual gesehen, lag der Abfall in den KO-Mäusen bei durchschnittlich 36%; bei den Wildtyp-Mäusen hingegen bei 31%.

Zunächst scheint es verwunderlich, dass die Gabe von 50 mg/kg Histonen in beiden Gruppen einen gleich starken Verbrauch an Plättchen hervorruft, die Gabe von 25 mg/kg Histonen jedoch einen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen leicht erhöhten Verbrauch in ADAMTS13KO-Mäusen zeigt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Dosis von 50 mg/kg Histonen, welche nach Fuchs et al. 2011, auch der Wert ist bei dem 50 % der Tiere versterben (LD50-Wert) (Fuchs et al., 2011), für den Körper bereits so hoch ist, dass hierdurch schon der maximale durch Histone hervorrufbare Schaden ausgelöst wird. Dadurch wäre der Verbrauch unabhängig von der ADAMTS13-Defizienz bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen gleich hoch. Erst eine Verringerung der Dosis deutet auf eine möglicherweise höhere Empfindlichkeit der ADAMTS13KO-Mäuse gegenüber Histonen.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Troponinwerten der Wildtyp- und der ADAMTS13KO-Gruppe nach Gabe von 25 mg/kg Histonen. Die Troponinwerte sind in der KO-Gruppe erhöht. Die LDH-Werte schwanken nach Gabe von 25 mg/kg Histonen innerhalb der Wildtyp-Gruppe ( $631,7 \pm 143,5$  U/l LDH) im Gegensatz zu den Werten in der ADAMTS13KO-Gruppe ( $449,0 \pm 33,53$  U/l LDH) sehr stark. Auch hier kann keine verbindliche Aussage getroffen werden, da die Gruppengröße zu gering ist.

Gab man zu den 25 mg/kg Histonen zusätzlich 100 IE/kg rhVWF, konnte man einen höheren Plättchenverbrauch bei beiden Gruppen beobachten, als in den Versuchen in denen nur 25 mg/kg Histone oder nur 100 IE/kg rhVWF injiziert wurde. Der prothrombotische Effekt wurde durch die Kombination der beiden Substanzen also verstärkt.

Histone werden von Zellen entweder in Form von freien „extrazellulären“ Histonen, als Teil von NETs oder als Teil von Nukleosomen ausgeschieden. Unser Versuch zeigt die Wirkung von extrazellulären Histonen. Die beobachtete leicht erhöhte Empfindlichkeit der ADAMTS13KO-Mäuse gegenüber Histonen könnte mit der zytotoxischen Wirkung von extrazellulären Histonen und/oder einer Histon-induzierten Plättchenaktivierung zusammenhängen. Eine Histon-induzierte Plättchenaktivierung findet unter normalen Umständen zum Beispiel bei der Bekämpfung von Bakterien im Körper statt (Fuchs et al., 2010, 2011; Semeraro et al., 2011). Untersuchungen von Fuchs und Semeraro zeigten, dass Plättchen, welche mit Histonen versetzt werden, aggregieren (Fuchs et al., 2010, 2011; Semeraro et al., 2011). Extrazelluläre Histone können auf verschiedene Weise eine Plättchenaktivierung bewirken. Sie können die Produktion von Zytokinen und die Expression von TLR2 und TLR4 auf Plättchen induzieren. Die Aktivierung von TLR2 und TLR4 leitet Vorgänge wie die Plättchenaggregation, die ATP-Ausschüttung und die P-Selectin-Aktivierung ein (Xu et al., 2011). Ammollo beschreibt, dass Histone außerdem die Produktion von Thrombin im Plasma in Anwesenheit von Thrombomodulin steigern und belegt so einen weiteren Mechanismus der Plättchenaktivierung. Histone können auch eine Erhöhung des intrazellulären Calciums in Plättchen hervorrufen (Fuchs et al., 2011), was zu einer Aktivierung der Plättchen und zur Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors führt. Der GPIIb/IIIa ist maßgeblich an den Vorgängen der Hämostase beteiligt, er vermittelt unter anderem die Aggregation der Plättchen. Wie Xu et al. berichten, sind extrazelluläre Histone zusätzlich für die Entwicklung von Sepsis und endothelialer Dysfunktion verantwortlich (Xu et al., 2009, 2011). Extrazelluläre Histone können die Blutgerinnung aber auch behindern, indem sie zum Beispiel mit verschiedenen Proteinen im Plasma interagieren. Wie Ammollo et al. beschreiben, kann die Blutgerinnung durch Histone verzögert und die Fibrinolyse stimuliert werden (Ammollo et al., 2015). Durch die Bindung der Histone an Protein C und Thrombomodulin kommt es zu einer reduzierten Aktivierung des Thrombomodulin abhängigen Protein Cs. Aktiviertes Protein C hat unter anderem eine antikoagulatorische Eigenschaft. Es wird angenommen, dass die Hemmung des Protein C für die Bildung von Mikrothrombosen bei Organischämien und starken Entzündungen verantwortlich ist (Ammollo et al., 2011; Esmon, 2003).

#### Die Rolle von Histonen bei Infektionen: NETs

Histone treten auch in NETs auf, wo sie eine zusätzliche Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien und anderen Pathogenen spielen. Dringen Pathogene in unseren Körper ein, muss das angeborene Immunsystem eingreifen. Neutrophile Granulozyten stehen bei der direkten Bekämpfung an erster Stelle (Brinkmann et al., 2004). Neben der Phagozytose und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist das Ausscheiden von NETs (neutrophile

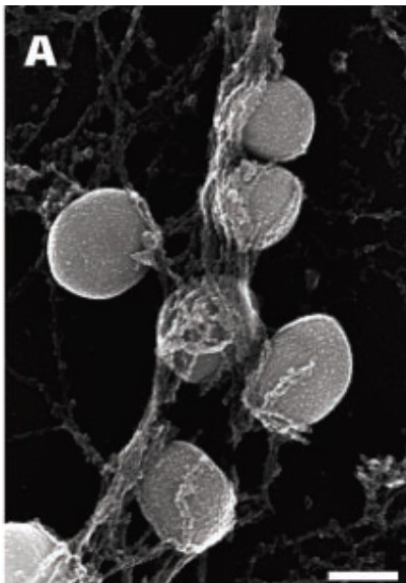


Abbildung 86: Bakterien, welche sich in NETs verfangen haben. Abbildung aus Brinkmann et al. 2004.

extracellular traps) bei aktivierten Neutrophilen ein wichtiger Teil der Immunabwehr (Mayadas et al., 2014). Die Aktivierung der Neutrophilen kann zum Beispiel über LPS oder Interleukin 8 (IL8) stattfinden (Brinkmann et al., 2004). Wie auch extrazelluläre Histone, fördern NETs die Blutgerinnung. Fuchs et al. beobachteten, dass NETs, VWF, Fibronektin und Fibrinogen binden. Dadurch wird die Aktivierung von Plättchen gefördert und es kommt zur Bildung von Thromben (Fuchs et al., 2012). Esmon et al. bestätigten den Zusammenhang von Infektionen und Blutgerinnung. Sie berichteten, dass Endotoxine die Koagulation aktivieren, den Antikoagulationsmechanismus herunterregulieren und die Wirkung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors verstärken (Esmon et al., 2011).

Die Gabe von extrazellulären Histonen kann, wie erörtert, eine Vielzahl von verschiedenen Mechanismen in Gang setzen, deren letzter Schritt stets zu einer Aktivierung der Plättchen und dadurch zu einer erhöhten Thromboseneigung führt. Für TTP-Patienten mit einer hereditären ADAMTS13-Defizienz bzw. mit einer erworbenen Defizienz sind Infektionen daher denkbar ungünstig und häufig Auslöser eines TTP-Schubs.

Der Plättchenabfall in beiden Mausgruppen nach Gabe von zusätzlich injizierten Histonen spricht dafür, dass die Koagulation durch extrazelluläre Histone aktiviert wurde und dadurch eine erhöhte Thrombosegefahr besteht. Im übertragenen Sinne wird so auch anhand des Beispiels von Histonen erklärt, wie und warum Infektionen bei TTP-Patienten ein erhöhtes Thromboserisiko darstellen und TTP-Schübe bewirken können.

Der im „Gabe von 25mg/kg Histone“ Versuch beobachtete Unterschied von 5% im Plättchenverbrauch ist relativ gering und könnte auch auf einen methodischen Fehler zurückzuführen sein. Eine höhere Empfindlichkeit der ADAMTS13-defizienten Mäuse, müsste folglich durch eine größere Versuchsgruppe verifiziert werden. Es gilt außerdem zu beachten, dass im Versuch mit 20 Minuten eine sehr kurze Wirkzeit der Histone gegeben war. Hätte man das Blut beispielsweise erst nach einer oder mehreren Stunden gemessen, wäre möglicherweise ein deutlicher Unterschied zwischen ADAMTS13KO und Wildtyp-Mäusen aufgetreten. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden die Tiere jedoch nicht länger behandelt. Ein weiterer untersuchter „Infektionstrigger“ ist LPS.

#### 4.5.2 Die Auswirkungen von ADAMTS13-Defizienz bei Gabe von LPS

##### **ADAMTS13-Defizienz wirkt sich bei Gabe von LPS leicht nachteilig auf Mäuse aus.**

Bei einer Injektion mit LPS reagierten die ADAMTS13KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen etwas empfindlicher. Im Versuch „Gabe von 1 mg/kg LPS“ betrug der Plättchenverbrauch 33% bei Wildtyp- bzw. 49% bei ADAMTS13KO-Mäusen. Die Troponinwerte waren nicht auffällig erhöht und wiesen keine signifikanten Unterschiede zur Vergleichsgruppe auf (Troponin bei Wildtyp-Mäusen:  $0,3780 \pm 0,2402$  ng/ml und bei ADAMTS13KO-Mäusen:  $0,3813 \pm 0,2397$  ng/ml). Die LDH-Werte waren insgesamt eher niedrig und in der ADAMTS13KO-Gruppe nur geringfügig und nicht signifikant erhöht (Wildtyp:  $499,7 \pm 91,03$  U/l; ADAMTS13KO:  $521,3 \pm 108,0$  U/l). Nach einer höheren Gabe von LPS (2 mg/kg) veränderte sich der Plättchenverbrauch kaum (Wildtyp-Mäuse: 35% und ADAMTS13KO-Mäuse: 47%). Die Troponinwerte waren bei Gabe von 2 mg/kg LPS im Vergleich zur Gabe von 1 mg/kg LPS nur leicht erhöht ( $0,5885 \pm 0,3385$  ng/ml bei Wildtyp-Mäusen und  $0,7235 \pm 0,7235$  ng/ml bei ADAMTS13KO-Mäusen). Auch hier waren die Werte bei den ADAMTS13KO-Mäusen etwas höher. Die LDH-Werte lagen bei den Wildtypen bei  $494,3 \pm 123,2$  U/l und bei den ADAMTS13KO-Mäusen bei  $532,7 \pm 57,44$  U/l. Sie waren nicht signifikant verschieden.

Bei zusätzlicher Gabe von 100 IE/kg rhVWF war in beiden Gruppen ein stärkerer Plättchenverbrauch zu beobachten. Die LDH-Werte waren tendenziell höher, die Troponinwerte blieben gleich.

Die Gabe des LPS von E. coli 0111: B4, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, wies in seiner Wirkung nur schwache Unterschiede zwischen den ADAMTS13KO- und den Wildtyp-Mäusen in Bezug auf Plättchenverbrauch, Troponin- oder LDH-Werte auf.

##### Die Aktivierung des Immunsystems durch LPS und die Auswirkung auf ADAMTS13KO-Mäuse

LPS hat einen starken Einfluss auf die Aktivierung der Endothel- und Immunzellen (Kabanov et al., 2016). Lipopolysaccharide, die als Teil der Membran gramnegativer Bakterien vom Immunsystem als „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ (engl. Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) erkannt werden, bewirken, so wie Histone, eine Immunantwort (Aslam et al., 2006). Auch in akuten TTP-Schüben beobachtet man eine Aktivierung des Endothels in Form einer vermehrten Sekretion von VWF sowie einer vermehrten Ansammlung inflammatorischer Zytokine im Plasma (z. Bsp. IL6, IL2 und TNF- $\alpha$ ) (Wada et al., 1992). Das spricht für die Aktivierung des Immunsystems während beziehungsweise bereits vor einem Schub (Wada et al., 1992). Neben der Stimulierung der NET-Bildung (siehe Seite 97)

(Brinkmann et al., 2004), bewirkt LPS auch eine Expressierung von Toll-like-Rezeptoren (Aslam et al., 2006). Aslam et al. fanden heraus, dass murine und humane Plättchen, die für das Immunsystem wichtigen Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR9 exprimieren, wenn sie mit LPS stimuliert werden. TLRs auf Plättchen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Kopplung von Entzündung und Hämostase (Semeraro et al., 2011, Schattner 2018) und könnten daher eine weitere Erklärung für TTP-Schübe während einer Infektion liefern. Zhao et al. zeigten, dass bei der LPS-induzierten Thrombozytopenie auch eine Aktivierung des Komplementsystems stattfindet (Zhao et al., 2002). Sie konnten dies insbesondere für das LPS „E.coli O9“ und „Klebsiella O3s“ nachweisen (Zhao et al., 2002). Über den Rezeptor TLR4 auf Monozyten aktiviert LPS den Myd88-abhängigen und Myd88-unabhängigen Signalweg. Diese Aktivierung führt zur Produktion von NF- $\kappa$ B, was wiederum die Synthese verschiedener inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL6, IL8 und IL10, anregt (Bandow et al., 2012; Hochdörfer et al., 2013; Kabanov et al., 2016; Lu et al., 2008).

Alle diese Mechanismen können bei Infektionen zu TTP-Schüben beitragen und erklären somit das häufige Auftreten von TTP-Schüben nach Infektionen.

#### Verstärkte Plättchenaggregation durch LPS

LPS kann zusätzlich, wie Histone auch, die Expression von P-Selectin und die ADP-Sekretion auslösen, wodurch eine stärkere Plättchenaggregation stattfindet. Den Zusammenhang zwischen LPS und Thrombozytopenie betrachten Xiang et al. kritisch. Für sie ist es unklar, ob die LPS-induzierte Thrombozytopenie mit der Gerinnungskaskade und der Immunantwort des Körpers zusammenhängt oder ob viel eher andere Mechanismen für die LPS-induzierte Thrombozytopenie verantwortlich sind (Xiang et al., 2015).

In vitro stimulieren, die durch LPS indirekt ausgeschiedenen, inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF- $\alpha$  die Sekretion von UL-VWF (Bernardo et al. 2004) und tragen so zu einer Plättchenaggregation bei. Reiter et al. beobachteten nach Gabe von LPS eine erhöhte Ausscheidung von IL6, eine erhöhte VWF-Aktivität und eine verminderte Aktivität von ADAMTS13 in Mäusen (Reiter et al., 2005). Da IL6 ADAMTS13 inhibiert, diskutierten Reiter et al. die Möglichkeit, dass ADAMTS13 durch LPS indirekt in der Aktivität vermindert wird. Eine Verminderung der ADAMTS13 Aktivität in der Wildtyp-Gruppe, könnte erklären, warum in unseren Versuchen zwischen ADAMTS13KO- und Wildtyp-Mäusen kein großer Unterschied im Plättchenverbrauch und den anderen Tests zu sehen war. Reiter et al. erwägen jedoch auch, dass durch die vermehrte VWF Ausscheidung bei Infektionen ADAMTS13 „verbraucht“ wird und die geringere Aktivität daher nur indirekt mit IL6 zusammenhängt. Beispielsweise demonstrierten Mannucci et al., dass in Patienten bei einer Erhöhung des VWF gleichzeitig die Aktivität von ADAMTS13 abnimmt (Mannucci et al., 2004) Eine Ar-

beit von Arditi et al. zeigte, dass LPS zusätzlich Endothelschäden induziert (Arditi et al., 1993), was neben der Aktivierung des Immunsystems bei der TTP eine große Rolle spielen dürfte.

Da LPS extreme Auswirkungen auf den Körper hat, wurde der Versuch aufgrund des Tierwohls nach 3 h (2 mg LPS) bzw. 5 h (1 mg/kg LPS) beendet. Die im Vergleich zu anderen Versuchen relativ kurze Einwirkdauer könnte erklären, warum zwischen den beiden Mausgruppen nur geringe Unterschiede zu beobachten waren. Würde man länger mit LPS behandeln, wären eventuell größere Unterschiede und höhere Troponin- und Plättchenabfallwerte zu beobachten. Ein weiterer Grund wäre die Hemmung von ADAMTS13 in den Wildtyp-Mäusen, die durch LPS indirekt stattfindet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Auswirkungen nach Gabe von LPS in erster Linie auf der Aktivierung des Immunsystems beruhen. Bei den ADAMTS13KO-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen zeigten sich ein verstärkter Plättchenverbrauch und ein Anstieg des Troponins nach Gabe von LPS. Dieser Versuch gibt Hinweise auf eine höhere Anfälligkeit von ADAMTS13-defizienten Patienten gegenüber Infektionen durch Gram-negative Bakterien. Indirekt wird möglicherweise die Sekretion ultralanger sehr aktiver VWF-Multimere stimuliert und kann so zu Mikrothrombosen führen, die aufgrund einer ADAMTS13-Defizienz bei hereditärer TTP oder erworbener TTP wiederum zu Schüben führen können. Dies könnte erklären, warum TTP-Patienten, welche eine verminderte oder nicht vorhandene ADAMTS13-Aktivität besitzen, einen Schub durch Infektionen erleiden können. Da LPS über IL6 indirekt die ADAMTS13-Aktivität mindert und daher auch in den Wildtyp-Mäusen die ADAMTS13-Aktivität gemindert ist, wurden möglicherweise keine großen Unterschiede zwischen Wildtyp und ADAMTS13KO-Mäusen gefunden.

#### 4.6 Chinin und Quensyl® (Hydroxychloroquin): TTP oder TMA?

**Das Chininderivat Hydroxychloroquin zeigt bei einmaliger Gabe nur leichte Auswirkungen auf ADAMTS13KO-Mäuse.**

Chinin ist als Trigger für TTP/HUS und TMA beim Menschen bekannt. Dennoch konnte Ebner in ADAMTS13KO-Mäusen keine TTP Symptome durch Chinin-Gabe beobachten (Ebner, 2015). Daher testeten wir Quensyl® (Hydroxychloroquin, auch HCQ) aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zum Chinin. In unserem Versuch mit Quensyl® reagierten nur die ADAMTS13KO-Mäuse mit einem signifikanten Plättchenverbrauch. Dieser ist jedoch mit 16% bei den ADAMTS13KO-Mäusen im Vergleich zu den anderen Triggern recht niedrig. Die

Troponin- und LDH-Werte waren insgesamt leicht erhöht in den ADAMTS13KO-Mäusen. (Wildtyp:  $0,3823 \pm 0,2633$  ng/ml N=2, ADAMTS13KO:  $0,5850 \pm 0,2850$  ng/ml N=3) und LDH-Werte ( $720,0 \pm 161,4$  U/l bei Wildtyp- und  $1139 \pm 143,9$  U/l bei ADAMTS13KO-Mäusen). Eine Erhöhung der Fallzahl sowie eine längere HCQ-Behandlung könnte eine höhere Empfindlichkeit der ADAMTS13KO-Mäuse bestätigen oder verwerfen.

#### Die Wirkung von Chinin, Chinin-Derivaten und Hydroxychloroquin

Als Auslöser für eine Thrombozytopenie/Purpura wurde Chinin schon 1865 in der medizinischen Fachzeitschrift „The Lancet“ erwähnt (Vipan, 1865). Die Verbindung zwischen Chinin und HUS (HUS-TTP) wurde erstmals Anfang der 90er Jahre geknüpft und seither wurde der Zusammenhang erforscht (Crum & Gable, 2000).

Kojouri beschrieb 2001 Chinin als einen häufigen Auslöser der medikamenteninduzierten TTP (Kojouri et al., 2001). Chinin kann, wie wiederholt dokumentiert, zu schweren Nebenwirkungen bis hin zum anaphylaktischen Schock führen (Liles et al., 2016). Baliga et. al. schrieben in ihrem Fallbericht (Baliga & Wingo, 2003), dass der typische Chinin-induzierte TTP-Patient, weiblich und mittleren Alters ist und außerdem bereits in der Vergangenheit mit Chinin behandelt wurde. Sie beschrieben, dass 88 dieser Patienten nach Einnahme von Chinin unter hämatologischen Beschwerden litten (79 davon an Thrombozytopenie), 44 Hautveränderungen zeigten, 37 Nierenbeschwerden hatten, 15 systemische Beschwerden erlitten und sich bei 13 Patienten lebertoxische Komplikationen entwickelten. Bei den restlichen Patienten gab es vereinzelt weitere Beschwerden. Auffällig ist, dass Chinin teilweise multisystemische Beschwerden im Körper bewirkt.

Bei TTP-Patienten wird ein Schub am häufigsten durch chininhaltige Getränke und Limptar® (Chininsulfat, gegen Wadenkrämpfe) ausgelöst (Information aus dem TTP-Patientenkollektiv von Frau Dr. I. Scharrer, Uniklinik Mainz). Liles et al. fanden in ihrer Metaanalyse heraus, dass bei einem Großteil der Patienten (72%) die Chinin-induzierte Thrombozytopenie nach Einnahme von Tabletten gegen Wadenkrämpfe auftrat (Liles et al., 2016).

Auffällig ist, dass Chinin bisweilen sofort nach Einnahme zu heftigen Symptomen führen kann. George et al. veröffentlichten den Fall einer jungen Frau, welche nach nur einem Schluck eines chininhaltigen Getränks einen plötzlichen, TTP-ähnlichen, „Schub“ erlitt. Die Plättchenzahl war nur leicht verringert und die (erst) einige Tage später gemessene ADAMTS13-Aktivität lag bei 100%. Diese Werte schließen eine TTP eher aus. Aufgrund der gefundenen Chinin-Antikörper gingen George et al. von einer Chinin-induzierten Thrombozytopenie aus (George et al., 2017).

Liles et al. untersuchten in einer Metaanalyse die Nebenwirkungen von Chinin und kon-

zentrierten sich dabei auf die immunvermittelten Fälle (Liles et al., 2016). Unter anderem berichteten sie dabei von 114 Publikationen, in denen 142 Patienten eine immunvermittelte Reaktion zeigten. Bei 33 Patienten wurde eine Chinin-induzierte TMA beschrieben, bei 22 davon konnte man aber eine TTP ausschließen.

### Der Wirkmechanismus von Chinin

#### Bildung von Antikörpern gegen Chinin

Nach Gabe von Chinin und chininverwandten Substanzen und daraus resultierenden Komplikationen, geht man von einer Medikamenten-induzierten Bildung von Antikörpern aus (Baliga & Wingo, 2003). Zhu et al. nehmen an, dass Chinin amphipathische Eigenschaften besitzt, welche es befähigen, sich in die Antigenbindestelle von im Körper befindlichen Antikörpern zu integrieren. Dadurch können Hybrid-Paratope gebildet werden, die eine erhöhte Affinität zu Zelloberflächen-Antigenen haben (Zhu et al., 2015). Diese molekularen Eigenschaften könnten erklären, warum Chinin häufig zu medikamenteninduzierten Beschwerden führt (Liles et al., 2016). Denkbar wäre auch die Bildung von Antikörpern gegen ADAMTS13 durch Chinin oder chininverwandte Substanzen. Eine Bildung von Antikörpern ist wohl auch Grund für die von Patienten beschriebene Hypersensitivität gegenüber Chinin, selbst Jahre nach einer Behandlung mit chininhaltigen Medikamenten. (Barr et al., 1990). Bougie et al. beschreiben bei Untersuchungen zur Chinin-abhängigen Purpura, das Vorkommen von einzigartigen Antikörpern gegen Integrin GPIIb/IIIa, welche nur in Anwesenheit von Chinin an das GPIIb/IIIa der Plättchen binden und so eine Thrombozytopenie herbeiführen (Bougie et al., 2016). Durch die Antikörper könnte neben der Aggregation von Plättchen zusätzlich eine Endothelschädigung entstehen, welche zu einer vermehrten VWF Ausscheidung führt und bevorzugt aber nicht ausschließlich bei Menschen mit hereditärer TTP einen TTP-Schub auslösen könnte.

In den Versuchen von K. Ebner bewirkte Chinin keine Schübe in ADAMTS13KO-Mäusen, obwohl sie bis zu 3-wöchige Behandlungen durchführte (Ebner, 2015). Dies spricht gegen einen Einfluss von Chinin auf ADAMTS13-Defizienz bei Mäusen. Da Chinin-induzierte TTP in der Uniklinik Mainz bei Patienten beobachtet wurde (bisher unveröffentlichte Daten, Dr. I. Scharrer), könnten diese speziellen Fälle mit einer individuellen genetischen Disposition oder dem Interagieren verschiedener Mechanismen zu erklären sein. Ob es sich bei den durch Chinin erzeugten hämatologischen Beschwerden um eine Chinin-induzierte TTP, HUS oder TMA handelt, ist umstritten. Eine Chinin-induzierte TTP scheint ein Sonderfall zu sein. In der neueren Literatur ist im Zusammenhang mit Chinin vermehrt die Rede von einer medikamenteninduzierten TMA (Liles et al., 2016; Page et al., 2018).

### Hydroxychloroquin und TTP

Im Gegensatz zu Chinin und den Chininderivaten Mefloquine und Chinidin (Fiaccadori et al., 2006; Kojouri et al., 2001) sind Fälle von HCQ-induzierter TTP nur spärlich belegt. So findet man die erste Publikation, die sich mit einem Verdachtsfall einer HCQ-induzierter TTP auseinandersetzt erst 2017 (Fromm, 2017). 2009 wurde unseres Wissens erstmals von einer möglichen Verbindung zwischen TTP und HCQ in der Literatur berichtet (Letchumanan et al., 2009). Aus der Uniklinik Mainz ist uns ein bisher unveröffentlichter Fall von schwerer TTP nach Gabe von HCQ in Form von Quensyl® bekannt.

HCQ ist ein bekanntes Immunsuppressivum. In vitro wurde gezeigt, dass HCQ die T-Zell Aktivierung verhindert (Goldman et al., 2000). Durch das Erhöhen des pH-Werts in Lysosomen und Endosomen kann HCQ die Antigen-Prozessierung verändern, was zu einer Trennung der invarianten Kette des Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse II-Komplexes (MHC-Klasse-II-Komplex) führt (Lombard-Platlet et al., 1993).

Dadurch wird die Antigen-Bindung verhindert und eine Immunaktivierung erschwert. HCQ vermindert zusätzlich die Sekretion von Zytokinen, wie zum Beispiel IL6 and TNF- $\alpha$  (Gilman et al., 1996). Weitere Wirkungen von HCQ sind die Störung der Plättchenfunktion (Achuthan et al., 2015) und das Inhibieren von endosomalen TLRs (Kuznik et al., 2011). Wie Müller-Calleja et al. 2016 zeigen konnten, behindert Hydroxychloroquin darüber hinaus den proinflammatorischen Signalweg über NADPH-Oxidase (NOX) (Müller-Calleja et al., 2016).

Die immunsuppressiven Eigenschaften und die Anwendung von HCQ gegen entzündliche Autoimmunerkrankungen schließen eine ADAMTS13-Antikörperbildung aufgrund von HCQ eher aus. Wahrscheinlicher ist, dass HCQ durch eine Endothelschädigung einen TTP-Schub hervorrufen könnte. HCQ bewirkt in Lysosomen die Veränderung des pH-Werts, was unter anderem die Kollagen-Synthese reduziert (Neblock & Berg, 1982). Dementsprechend könnte eine Reduzierung der Kollagen-Synthese zu geschwächtem Endothel in den Blutgefäßen führen.

Die geringen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen im hier durchgeführten Versuch und dem Versuch von K. Ebner legen nahe, dass Chinin und chininverwandte Stoffe zumindest keine unmittelbare nachteilige Wirkung auf ADAMTS13-defiziente Mäuse haben. Falls eine höhere Empfindlichkeit gegenüber HCQ in ADAMTS13-defizienten Mäusen gegeben ist und diese nicht mit der Bildung von Autoantikörpern zusammenhängt, könnte es neben einer wahrscheinlichen Schädigung des Endothels einen weiteren bisher unbekannten Mechanismus geben, der die Interaktion zwischen Chi-

nin/Hydroxychloroquin und ADAMTS13 beeinflusst. Eine Messung von Antikörpern gegen HCQ wäre in weiteren Untersuchungen zur Triggerwirkung von HCQ hilfreich und aufschlussgebend. Vergleicht man die Literatur so scheint eine HCQ-induzierte TTP eine Ausnahme zu sein und ist möglicherweise eher auf eine spezifische genetische Disposition zurückzuführen; man darf aber auch nicht ausschließen, dass es aufgrund der Seltenheit einer HCQ-induzierten TTP möglicherweise eine höhere Dunkelziffer gibt.

## 4.7 Ticlopidin

### **Eine einmalige Gabe von Ticlopidin hat keinen Einfluss auf ADAMTS13KO-Mäuse.**

In unserem Versuch konnten 8 h nach Gabe von 10 mg/kg Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF keine TTP-ähnlichen Zustände in den Mäusen beobachtet werden. Die ADAMTS13KO-Mäuse reagierten unwesentlich empfindlicher im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, was man auch auf die zusätzliche Gabe von 100 IE/kg rhVWF zurückführen kann. In den Wildtypen betrug der Plättchenabfall durchschnittlich 6%, in den ADAMTS13KO-Mäusen durchschnittlich 27%. Der Troponinwert war geringfügig erhöht und zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Wildtyp:  $0,0 \pm 0,0$  ng/ml und ADAMTS13KO-Mäusen  $0,8102 \pm 0,2849$  ng/ml). Die LDH-Werte waren in beiden Gruppen erhöht. Trotz tendenziell höheren Werten in den ADAMTS13KO-Mäusen waren die Unterschiede nicht signifikant. Man muss auch bedenken, dass die Tiere zusätzlich mit 100 IE/kg rhVWF behandelt wurden und dies zum Ergebnis beiträgt. Interessanterweise ist der Plättchenabfall in diesem Versuch aber niedriger als der Abfall im Versuch „Gabe von 100 IE/kg rhVWF“, was wiederum mit der Wirkung von Ticlopidin als Plättchenaggregationshemmer zusammenhängen könnte. In der Literatur wird vermutet, dass Ticlopidin durch die Bildung von ADAMTS13-Autoantikörper oder durch Endothelschädigung eine TTP auslöst. Jacob et al. veröffentlichten in einer Metaanalyse über Ticlopidin-assoziierte TTP, dass ein Teil (20%) der untersuchten TTP-Patienten nicht an einer schweren ADAMTS13-Defizienz litten, alle Patienten aber neutralisierende ADAMTS13-Autoantikörper im Blut hatten. Auch Bennett et al. publizierten das Vorkommen von ADAMTS13-Autoantikörpern bei 100% der untersuchten Patienten (Bennett et al., 2013; Jacob et al., 2012).

Ticlopidin-induzierte TTP tritt, wie Bennett et al. schreiben, in der Regel erst nach einer 2- bis 12-wöchigen Behandlung mit Ticlopidin auf. Obwohl einige Autoren berichten, dass Rückfälle bei Ticlopidin-induzierter TTP nach Absetzung des Medikaments selten bis gar nicht auftreten (Bennett et al., 1999; Chen et al., 1999; Jacob et al., 2012), ist aus dem Kollektiv der

Universitätsmedizin in Mainz ein TTP-Patientenfall bekannt, welcher sicher durch Ticlopidin getriggert wurde und seither viele Schübe erlitt.

Das Thienopyridin Ticlopidin wird aufgrund der Nebenwirkungen nicht mehr oder äußerst selten verschrieben und ist mittlerweile weitgehend durch die Thienopyridine Clopidogrel und Prasugrel ersetzt worden. Diese wurden auch mit TTP in Verbindung gebracht, wenngleich sie seltener eine TTP auslösen (Jacob et al., 2012). Die Tatsache, dass Clopidogrel und Ticlopidin eine unterschiedliche Wirkung im menschlichen Körper haben, könnte darauf deuten, dass bei der Anwendung dieser Thienopyridine unterschiedliche Mechanismen für die Auslösung der TTP verantwortlich sind.

Die Gabe von Ticlopidin bewirkt im Gegensatz zu Clopidogrel häufiger eine sehr schwere ADAMTS13-Defizienz bei Patienten (Bennett et al. 2007). Nach Bennett et al. wird Clopidogrel-assoziierte TTP nur in 12 von 1 Millionen behandelten Patienten ausgelöst (Verhältnis bei Ticlopidin: 1 zu 5000). Der Schub tritt bei Clopidogrel-assoziiierter TTP oft schon innerhalb von 2 Wochen Behandlung ein. Jacob et al. berichteten, dass bei Clopidogrel-assoziiierter TTP bisher keine Autoantikörper gefunden wurden (Jacob et al., 2012). Dagegen beschrieben Bennett et al. (Bennett et al., 2000) in einer Studie von 11 Patienten mit Clopidogrel-assoziiierter TTP, dass 2 Patienten eine schwere ADAMTS13-Defizienz und IgG-Antikörper gegen ADAMTS13 besaßen. Die Prasugrel-Fälle wurden nicht auf Autoantikörper getestet, und es ist daher unbekannt, inwiefern diese TTP-Patienten Autoantikörper besaßen. Befunde, insbesondere aus früheren Publikationen, bezüglich ADAMTS13-Defizienz und Antikörpern müssen unter Vorbehalt betrachtet werden. In den 80er und 90er Jahren und sogar noch heute ist häufig ein methodisch bedingtes Fehlen von Nachweisen in der Klinik ein Grund dafür, dass Antikörper gegen ADAMTS13 und ADAMTS13-Werte nicht ausreichend dokumentiert wurden.

Eine Messung von Antikörpern bei behandelten Mäusen hätte in unserem Versuch Aufschluss über die Antikörperbildung aufgrund von Ticlopidin geben können.

#### Der Wirkmechanismus von Ticlopidin

Der genaue Wirkmechanismus von Ticlopidin ist nicht geklärt. Der ADP-Inhibitor Ticlopidin hemmt und greift in die Thrombozytenmembranfunktion ein, indem er die Bindung zwischen Fibrinogen und Plättchen sowie die Plättchen-Plättchen-Interaktion hemmt (Fachinformation Ticlopidin, 2016; Gachet et al., 1990). Gesichert gilt, dass Ticlopidin nicht über eine Prostacyclin-Thromboxan-Antagonisierung wirkt. Die cAMP-Konzentration in Plättchen hat keinen Einfluss auf die Wirkung von Ticlopidin. Während Ticlopidin irreversibel an Plättchen bindet, bindet es an Plasmaproteine, wie Serumalbumin und Lipoproteine zu 98% reversibel

(Fachinformation Ticlopidin, 2016). Des Weiteren inhibiert Ticlopidin die Fibronektin-Bildung in Endothelzellen und beeinträchtigt so die Zell-Zell-Adhäsion und die Zell-Subendothel-Adhäsion, was wiederum möglicherweise einen Einfluss auf Plättchenaggregation und Thrombusformation hat (Chen et al., 1999). Wie Ha-Doung et al. beschreiben, ist Ticlopidin ein Inhibitor für das Cytochrom CYP450 2C19 (Ha-Duong et al., 2001), welches am Metabolismus von Steroiden, Fetten und verschiedenen Medikamenten beteiligt ist (Guengerich, 1992). Inwiefern das eine Auswirkung auf die Bildung einer TTP haben könnte, ist unbekannt.

#### Schäden am Endothel

In vitro konnte gezeigt werden, dass Ticlopidin das Wachstum von Endothelzellen verlangsamt und die Struktur verändert (Piovella et al., 1984). Das liegt daran, dass Ticlopidin die Produktion von extrazellulären Matrix-Komponenten (EZM) unterbrechen kann (Piovella et al., 1984). Diese sind wichtig für die Integrität der mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) (Piovella et al., 1984). Mauro et al. fanden einen Zusammenhang zwischen Thienopyridin-assoziiertes-TMA (wie zum Beispiel Ticlopidin), Apoptose von Endothelzellen und der Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Mauro et al., 2004). Der MAPK-Signalweg ist unter anderem verantwortlich für die Initiierung von Entzündungen und Apoptose. Mauro fand heraus, dass Ticlopidin und Ticlopidin-assoziiertes-TTP Plasma die EZM-MVEC Interaktionen veränderten und möglicherweise dadurch eine MVEC Apoptose bewirkte. Dafür untersuchten Mauro et al., ob das Plasma von Patienten einer Ticlopidin-assoziierten TTP eine Apoptose der MVEC bewirkt, wie dies der Fall bei Plasma von Patienten der idiopathischen TTP ist. Sie prüften weiter die Hypothese, dass EZM-Komponenten und MAPK-Signalkaskaden (Mitogen-activated-Protein Kinase) in diesen Prozess involviert sind. Es zeigte sich, dass Plasma von Ticlopidin-assoziierten TTP eine Apoptose bei den primären MVEC von Haut, Niere und Leber bewirkte. Das gleiche bewirkten pharmakologische Konzentrationen von Ticlopidin in Patienten mit Ticlopidin-assoziierten TTP.

Jacob et al. halten Antigenität oder molekulare Mimikry von Metaboliten des Ticlopidins, welche eine strukturelle Ähnlichkeit zu ADAMTS13 haben, für mögliche Auslöser der TTP (Jacob et al., 2012). Ticlopidin könnte möglicherweise als Hapten agieren oder Metabolite von Ticlopidin könnten einen Komplex mit ADAMTS13 formen und diesen dadurch in seiner Wirksamkeit hindern (Jacob et al., 2012). Ticlopidin, Prasugrel und Clopidogrel bilden unterschiedliche Metabolite, was auch die unterschiedlichen Wirkungen innerhalb der Gruppe der Thienopyridine erklären könnte.

Auch die Empfindlichkeit gegenüber gewissen Thienopyridinen ist aufgrund genetischer Variationen individuell sehr unterschiedlich und wahrscheinlich mit ein Grund dafür, dass nur ein Teil der Patienten einen Thienopyridin-assoziierten TTP-Schub erleidet. So sind zum Beispiel viele kongenitale Variationen in den Purinrezeptoren der Thrombozyten beschrieben (Gachet, 2001), diese könnten die Wechselwirkung zwischen Ticlopidin, den Thrombozyten und ADAMTS13 beeinflussen.

Ein individueller Unterschied in der Metabolisierung von Ticlopidin kann ebenfalls verantwortlich für die Variationen in den Wirkungen sein, wie Coppola berichtet (Coppola, 2005). Die Umwandlung von Clopidogrel zum Beispiel geschieht über den Subtyp 3A4 des hepatischen Cytochrom-P-Systems (Lau et al., 2004). Die individuelle Aktivität des Enzyms hat scheinbar Einfluss auf die Metabolisierung von Clopidogrel und die aktiven Metaboliten (Lau et al., 2004).

Unser Ergebnis zeigt, dass Ticlopidin zumindest keine unmittelbaren Auswirkungen auf ADAMTS13-defiziente-Mäuse hat. Wie die Literatur zeigt, ist die Ticlopidin-induzierte TTP auf die Bildung von Autoantikörpern gegen ADAMTS13 und möglicherweise auf Endothelschädigung zurückzuführen. Da durch Ticlopidin bedingte TTP Symptome beim Menschen erst nach längerer Behandlungsdauer auftreten, sollten zukünftige Untersuchungen über den Zusammenhang von Ticlopidin und TTP im Mausmodell über mindestens 14 Tage durchgeführt werden. Sollten sich negative Auswirkungen bemerkbar machen, können eine Untersuchung des Endothels und ein Antikörpertest wichtige Hinweise erbringen.

#### 4.8 Die Gabe von Gemcitabin in ADAMTS13KO-Mäusen

**Gemcitabin bewirkt bei ADAMTS13KO-Mäusen einen sehr starken Plättchenverbrauch.**

Die 5-tägige Behandlung mit Gemcitabin bewirkte sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen einen signifikanten Plättchenverbrauch. Bei den Wildtyp-Mäusen wurde im Mittel ein prozentualer Verbrauch von 52% beobachtet. Die ADAMTS13KO-Mäuse zeigten Gemcitabin gegenüber eine sehr viel höhere Empfindlichkeit; bei ihnen wurde ein Verbrauch von 89% beobachtet. Ein vergleichsweise hoher Plättchenverbrauch wurde bei den ADAMTS13KO-Mäusen nur bei Behandlung mit 800 IE/kg rhVWF (90% Plättchenverbrauch) beobachtet.

Die Troponin-Konzentration war bei den ADAMTS13KO-Mäusen erhöht und im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (WT:  $0,09667 \pm 0,06114$  ng/ml vs AD-

AMTS13KO  $3,648 \pm 0,9373$  ng/ml). Die LDH-Werte waren bei ADAMTS13KO- und Wildtyp-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich (WT:  $682,5 \pm 135$  U/l. ADAMTS13KO:  $636,3 \pm 135,5$  U/l) und auch im Vergleich zu anderen Versuchen nicht auffällig hoch.

In der Literatur wird Gemcitabin mehrfach als Auslöser für TMA bzw. TPP erwähnt (De Smet et al., 2008; Izzedine et al., 2006; Kasi, 2011; Richmond et al., 2013; Zupancic et al., 2007). Da Gemcitabin seit 1996 zur Behandlung vieler Krebserkrankungen angewendet wird, ist die Gemcitabin-induzierte TMA bei Onkologen bekannt.

Der sehr hohe Plättchenverbrauch bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen ist wahrscheinlich auf eine verstärkte Ausschüttung von UL-VWF zurückzuführen. Dies könnte zum Beispiel durch Endothelschädigung geschehen. In den ADAMTS13KO-Mäusen hat die höhere Konzentration von UL-VWF im Blut eine stärkere Auswirkung. Eine ADAMTS13-Defizienz scheint jedoch nicht ausschlaggebend für die häufig beobachtete Gemcitabin-induzierte TTP/TMA zu sein. Auch der Plättchenverbrauch der Wildtyp-Mäuse war in unseren Versuchen bei Gabe von Gemcitabin hoch und sogar höher als nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF. In der Arbeit von Kasi wurde nur bei 13% der Gemcitabin-induzierten TTP-Patienten eine ADAMTS13-Defizienz verzeichnet (Kasi, 2011). Zusätzlich spielen die dosisabhängige Toxizität von Gemcitabin und die immunvermittelte Antwort bei der Gemcitabin-assoziierten-TTP eine Rolle (Richmond et al., 2013).

Die erhöhten Troponinwerte, der starke Plättchenverbrauch und die Blutbilder mit den vielen Fragmentozyten bei ADAMTS13KO-Mäusen weisen auf starke Zellschäden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Gemcitabin durch seine hohe Toxizität sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei ADAMTS13KO-Mäusen eine TTP bzw. ein TTP-ähnliches Krankheitsbild auslösen kann. Die ADAMTS13KO-Mäuse sind jedoch sehr viel anfälliger und zeigen stärkere Symptome, wie man an den Ergebnissen erkennen kann. Auf den Menschen übertragen bedeutet dies, dass Menschen mit ADAMTS13-Defizienz, sei sie genetischer oder idiopathischer Art, stärker gefährdet sind eine TTP durch Gemcitabin zu entwickeln, obgleich die Gemcitabin-induzierte TTP nicht unmittelbar mit der ADAMTS13 Defizienz zusammenhängt.

Inwiefern es sich bei den Gemcitabin-assoziierten TMA- oder TTP-Fällen wirklich um eine TTP handelt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

#### Der Wirkmechanismus von Gemcitabin

Die Schädigung des Endothels als maßgebende Ursacher der Gemcitabin-induzierten TTP?  
Neben der Eigenschaft als Pyrimidin-Antimetabolit wird Gemcitabin in der Literatur ein möglicherweise schädigender Einfluss auf das Endothel zugeschrieben. Bei Beschädigung des Endothels wird unter anderem der VWF aus den Weibel-Palade-Körperchen sezerniert und

tritt mit dem freigelegten Kollagen im Subendothel in Verbindung. Weitere Auswirkungen einer endothelialen Schädigung sind die Freisetzung von Nitritoxiden, erhöhte Sekretion von gewebespezifischem Plasminogen Aktivator (tPA: tissue Plasminogen Activator) sowie Thrombomodulin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (Thachil, 2007).

Auffällig ist die Erhöhung des Blutdrucks in vielen TMA-Patienten nach Gabe von Gemcitabin, wie Humphreys et al. berichten. Bei einigen Patienten führt die Gabe von Gemcitabin auch zu einer erschwerten Regulierung des Blutdrucks und einer Zunahme von notwendigen Blutdruckmedikamenten, falls diese bereits an Bluthochdruck litten. Bei Studien stellte sich heraus, dass der Blutdruck der Patienten mindestens eine Woche vor Ausbruch der TTP zu steigen begann. Bei 3 von 9 Patienten stieg der Blutdruck 6-10 Wochen vorher an (Humphreys et al., 2004). Khanal et al. berichten 2015 von maligner Hypertonie induzierter TMA und ihrer Ähnlichkeit zur TTP (Khanal et al., 2015). Wahrscheinlich ist die Erhöhung des Blutdrucks auch ein wichtiges Indiz für eine Schädigung des Endothels. Eine Messung des Blutdrucks ist bei endothelschädigenden Substanzen daher ein nicht zu vernachlässigender Prognosefaktor (Kasi et al., 2011; Khanal et al., 2015), und könnte bei TTP-Patienten Hinweise auf einen bevorstehenden TTP-Schub geben.

Geht man von einer Beschädigung des Endothels aus, kann der Verbrauch an Plättchen, sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen allein schon durch die erhöhte Sekretion von VWF erklärt werden.

#### Antikörperbildung durch Gemcitabin

Zupancic et al. zeigten zusätzlich, dass es zu Antikörperbildung kommen kann. Sie berichten von einer Erhöhung der IgG- und Glykoprotein-Antigen-Konzentration (Zupancic et al., 2007). Izzedine et al. halten eine Antikörperbildung gegen CD36, den Thrombospondin-Rezeptor (auf Plättchen auch GPIV genannt) für möglich. CD36 ist nur auf den mikrovaskulären Endothelzellen zu finden und nicht in den größeren Gefäßen (Izzedine et al., 2006). Dies würde auch erklären, warum in der Regel nur die Gefäße der Niere und des Gehirns von einer Schädigung betroffen sind, die Gefäße der Lunge und Leber hingegen nicht (Izzedine et al., 2006). Neben diesen zahlreichen möglichen Faktoren für die Entstehung einer TTP, besteht aber auch die Vermutung, dass Gemcitabin-induzierte TTP zusätzlich mit der bereits zugrundeliegenden Malignität, welche mit Gemcitabin behandelt wird, zusammenhängt (Snyder et al., 1993). Neben der Toxizität der Chemotherapeutika kann also auch der eigentliche Tumor eine mögliche Ursache bei der Entwicklung einer TTP sein; das Auftreten von TMAs beispielsweise wird häufig in Verbindung mit Tumoren beobachtet.

### Komplementaktivierung nach Gemcitabin Behandlung

Auch das Komplement könnte eine Rolle spielen. Turner et al. veröffentlichten einen Fall, der für eine Beteiligung des Komplementsystems bei Gemcitabin-induzierter TMA spricht (Turner et al., 2016).

## 4.9 Die Wirkung von Mitomycin auf ADAMTS13KO-Mäuse

### **Nach Gabe von Mitomycin C reagieren ADAMTS13KO-Mäuse mit einem höheren Plättchenverbrauch als Wildtyp-Mäuse.**

Bei Gabe von Mitomycin C konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen in der Plättchenzahl beobachtet werden. Die Zahl der Blutplättchen war bei den ADAMTS13KO-Mäusen um durchschnittlich 22% verringert, was im Vergleich zu anderen Versuchen wenig ist. Die Plättchenzahl der Wildtyp-Mäuse sank um nur durchschnittlich 7%. Die Troponinwerte waren kaum erhöht (WT:  $0,2933 \pm 0,2933$  ng/ml; ADAMTS13KO:  $0,2967 \pm 0,2967$  ng/ml). Die LDH-Werte hingegen waren auffallend hoch, in den Wildtyp-Mäusen sogar noch höher als in den ADAMTS13KO-Mäusen. Der mittlere LDH-Wert betrug bei Wildtyp-Mäusen  $2028 \pm 969,1$  U/l und bei ADAMTS13KO-Mäusen  $1833 \pm 1136$  U/l. Die Tatsache, dass Wildtyp-Mäuse und ADAMTS13-defiziente Mäuse eine so hohe LDH-Konzentration im Plasma aufwiesen, deutet auf eine hohe Zelltoxizität von Mitomycin hin. Fragmentozyten konnten vereinzelt gefunden werden; die Zahl war nicht auffällig hoch.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ADAMTS13-defiziente Mäuse nur mit dem Plättchenverbrauch leicht empfindlicher auf Mitomycin reagierten als die Wildtyp-Mäuse. Die relativ hohen LDH-Werte wurden in beiden Gruppen beobachtet. Aufgrund der Ergebnisse scheint die beobachtete Toxizität von Mitomycin nicht abhängig von einer ADAMTS13-Defizienz zu sein.

Dafür spricht auch die Literatur. Im Gegensatz zu anderen TTP-Fällen liegt bei der Mitomycin-induzierten TTP eher selten eine ADAMTS13-Defizienz vor (Kasper et al., 2007). Klinische Arbeiten haben gezeigt, dass 4-15% der mit Mitomycin behandelten Patienten eine TTP/HUS entwickeln (Valavaara & Nordman, 1985). Die Chemotherapeutika Mitomycin, Bleomycin, Cisplatin, Deoxycoformycin und Gemcitabin sind häufig genannte Trigger für TTP-Schübe (Leach et al., 1999) (siehe Tabelle 16, Anhang Seite 160). Oft findet man in der Literatur auch den Ausdruck der „Mitomycin-assoziierten TMA“, was zum einen mit der bereits erwähnten Unsicherheit bezüglich der Differentialdiagnose zusammenhängt zum anderen

aber auch damit zusammenhängen kann, dass zwar TTP-ähnliche Symptome beobachtet werden aber eine normale ADAMTS13-Aktivität gemessen wird. Man findet auch Beschreibungen zu Mitomycin-assoziierten HUS/TTP Fällen. Zum Beispiel berichten El-Ghazal et al. von einer Patientin, die sowohl Symptome einer TTP als auch eines HUS aufwies (El-Ghazal et al., 2011). Die Mitomycin-assoziierte TTP (und HUS) ist dosisabhängig (El-Ghazal et al., 2011; Zakarija et al., 2012), was möglicherweise auch die Ergebnisse dieses Versuchs erklärt. Wir konnten zeigen, dass eine einmalige Gabe von Mitomycin keine starken Auswirkungen auf die ADAMTS13KO-Mäuse hat. Eine höhere Dosis an Mitomycin und eine längere Behandlungsdauer würden womöglich die ADAMTS13KO-Mäuse stärker belasten.

Die Sterblichkeit bei Mitomycin-induzierter TTP ist mit bis zu 82% sehr hoch (Blake-Haskins et al., 2011; Cantrell et al., 1985; Sheldon & Slaughter, 1986). Eine Plasmapherese trägt selten zur Verbesserung einer Mitomycin-assoziierten TTP oder TMA bei (Cantrell et al., 1985; G. Shah, Yamin, & Smith, 2013). Teilweise helfen Steroide (Lesesne et al., 1989); mehr Erfolg verspricht Immunadsorption (Borghardt et al., 1998; Kasper et al., 2007) und die Behandlung mit Rituximab (Onitilo et al., 2017; Shah et al., 2013). Die Therapien, die bei einer Mitomycin-assoziierten TTP helfen, lassen vermuten, dass das Vorkommen von ADAMTS13-Autoantikörper oder ADAMTS13-Defizienz nicht die alleinige Ursache einer Mitomycin-assoziierten TTP/TMA sind. (In der Regel führt eine Plasmapherese bei ADAMTS13-Defizienz und Autoantikörpern in TTP-Patienten zur Besserung der TTP-Symptome.)

### Der Wirkmechanismus der Mitomycin-assoziierten TTP

#### Endothelschäden

Eine Arbeit von Seki et al. zeigte in in vitro Versuchen, dass Mitomycin C einen nicht reversiblen inhibierenden Effekt auf Endothelzellen hat (Seki et al., 2005).

Schon in frühen Arbeiten wurden Endothelschäden durch Mitomycin beschrieben. So veröffentlichte Cattell 1985 das Vorkommen von glomerulären und mikrovaskulären Nekrosen und Thrombosen sowie vaskuläre neointimale Verdickungen in Ratten nach Gabe von Mitomycin (Cattell, 1985). Je länger die Behandlung mit Mitomycin andauerte, desto schwerwiegender waren die Auswirkungen auf das Endothel.

#### Verminderte Prostacyclin-Produktion

Die Schädigung des Endothels durch Mitomycin C führt zusätzlich zu einer Absenkung der Prostacyclin-Produktion (Duperray et al., 1988). Prostacyclin (auch PGI<sub>2</sub> genannt) ist als Mediator am Entzündungsgeschehen beteiligt (Stitham et al., 2011) und inhibiert zudem die

Plättchenaggregation und Thrombus-Bildung am Subendothel (Weiss & Turitto, 1979). Die Verminderung von Prostacyclin könnte indirekt Thrombosen fördern, da Prostacyclin der stärkste endogene Plättchenaggregationshemmer und zusätzlich ein Vasodilator ist.

#### CIC: Zirkulierende Immunkomplexe

Neben der Schädigung des Endothels, geht man davon aus, dass zirkulierende Immunkomplexe (engl. CIC, circulating immunocomplexes), welche zum Beispiel Plättchenaggregate formen, eine wichtige Rolle bei der Mitomycin-induzierten TMA (TTP oder HUS) spielen (Cantrell et al., 1985; Kasper et al., 2007; Snyder et al., 1993). Die Tatsache, dass Immunadsorption bei Mitomycin-assoziiierter TMA hilft, ist ein Argument für die Bildung von Immunkomplexen.

Man kann davon ausgehen, dass es sich in den meisten Fällen der „Mitomycin-assoziierten TTP“ eher um eine TMA als eine TTP handelt. Selten sind Bakterien (wie bei dem HUS) oder eine ADAMTS13-Defizienz für die TTP-ähnlichen Symptome verantwortlich. Der eigentliche Grund einer Mitomycin-assoziierten TMA sind daher wohl eine Endothelschädigung und die Bildung von Immunkomplexen. Eine ADAMTS13-Defizienz macht Patienten für eine Mitomycin-assoziierte TMA anfälliger und wird daher auch öfter bei diesen beobachtet.

### 4.10 Troponin I- Messung: Ein wichtiger Biomarker für die TTP-Diagnose

Aufgrund sich häufender Studien und Autopsieberichte über kardiale Mikrothrombosen und Infarkte bei der TTP (Amorosi & Ultmann, 1965; Benhamou et al., 2015; Hawkins et al., 2008; Hosler & Hutchins, 2003; Ridolfi & Bell, 1981) wurde das Augenmerk in den letzten Jahren der TTP-Forschung zunehmend auf Schäden im Herzen gerichtet. Auch die Tatsache, dass Patienten mit Herzscheiden eine höhere Sterberate aufweisen (Gandhi et al., 2010), zeigt die Dringlichkeit der Untersuchung.

Die hohe Spezifität von kardialen Troponin für Myokardschäden bietet große Vorteile gegenüber der unspezifischen Kreatinkinase (Babuín & Jaffe, 2005; Wahla et al., 2008), die bisweilen auch als Marker für Herzscheiden verwendet wird.

Seit einigen Jahren wird von führender TTP-Spezialisten die Empfehlung ausgesprochen bei Einlieferung von TTP-Patienten eine Messung des cTnI vorzunehmen (Benhamou et al., 2015; Gandhi et al., 2010; Hughes et al., 2009; Patschan et al., 2006; Puyade et al., 2014). Eine Erhöhung der Troponin-Werte bei TTP-Patienten verlangt nach sofortigen Maßnahmen. Erhöhtes Troponin gilt bei Diagnose einer TTP als schlechter Prognosefaktor beim Menschen (Alwan et al., 2017; Benhamou et al., 2015; Scully et al., 2016). Die Studie von Gandhi zeigt

te, dass eine cTnI-Konzentration von über 0,25 ng/ml bei TTP-Patienten mit einem dreifachen Risiko für Therapieresistenz oder Tod verbunden war (Gandhi et al., 2010). Benhamou et al. zeigten ebenfalls, dass TTP-Patienten, welche der Krankheit erlagen, höhere cTnI-Werte aufwiesen und öfter an einer hohen Schubrate der TTP litten, als überlebende TTP-Patienten (Benhamou et al., 2015). Hughes et al. beschrieben in ihrer Arbeit 2009 einen Zusammenhang zwischen erhöhtem cTnT Gehalt, ADAMTS13-Autoantikörpern (IgG) und erhöhter Sterblichkeit. Über 67% der verstorbenen Patienten zeigten eine Erhöhung von cTnT in Verbindung mit IgG-Autoantikörpern (Hughes et al., 2009). 2016 wertete Scully Troponin als einen bedeutenden Prognosefaktor (Scully et al., 2016).

Tabelle 14: Studien zu kardialen Schäden bei der TTP. Entnommen aus Wahla 2008.

| Studie                                  | Art                   | n (TTP) | % Zahl der Patienten mit kardialen Schäden |
|-----------------------------------------|-----------------------|---------|--------------------------------------------|
| Patschan et al. (Patschan et al., 2006) | Retrospektive Kohorte | 32      | 40,6 <sup>1</sup>                          |
| McCarthy et al. (McCarthy et al., 2002) | Fallstudie            | 10      | 20 <sup>1</sup>                            |
| Hosler et al. (Hosler & Hutchins, 2003) | Fallstudie/Autopsie   | 25      | 100 <sup>2</sup>                           |
| Bell et al. (Bell et al., 1990)         | Fallstudie/ Autopsie  | 8       | 100 <sup>2</sup>                           |
| Ridolfi et al. (Ridolfi & Bell, 1981)   | Fallstudie/ Autopsie  | 17      | 76,4 <sup>2</sup>                          |
| Siersema et al. (Siersema et al., 1989) | Fallstudie/ Autopsie  | 3       | 100 <sup>2</sup>                           |

1: Herzinfarkt mit erhöhten kardialen Enzymen

2: Thrombi auf histologischen Schnitten bei der Autopsie

In unserer Arbeit konnten wir in ADAMTS13KO-Mäusen einen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöhten Troponin I-Spiegel nach Gabe von 500 IE/kg rhVWF, 250 IE/kg rhVWF, Gemcitabin und Mitomycin in Verbindung mit 100 IE/kg rhVWF beobachten. Die höchsten Werte wurden bei Gabe von 800 IE/kg rhVWF in ADAMTS13KO-Mäusen gemessen (höchster Wert: 34,53 ng/ml).

Nemmar et al. beschreiben eine Konzentration von etwa 0,2 ng/ml Troponin I in Kontroll-Mäusen als Normalzustand (Nemmar et al., 2017). Es gilt zu bedenken, dass Nemmar Mäuse des Balb/c Stamms (und nicht des 129SV-Stamms) untersuchte. Wie bereits erwähnt, können sich physiologische Werte stammbedingt in Mäusen voneinander unterscheiden. Wir haben keine Werte von Mäusen im Normalzustand. Da Kogenate<sup>®</sup> und Wilfactin in den Mäusen keinen signifikanten Plättchenverbrauch bewirkten, gehen wir davon aus, dass die gemessenen Troponin-Werte dieser Versuche in etwa den „Nullwert“ abbilden. Berechnet man die

Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aus den Kogenate<sup>®</sup>- und Wilfactin-Versuchen, kommt man auf einen Baseline-Wert von  $0,13 \pm 0,06$  ng/ml für die Wildtypen und auf einen Baseline-Wert von  $0,16 \pm 0,07$  ng/ml für die ADAMTS13KO-Mäuse. (Die Werte der Wildtyp- und ADAMTS13KO-Gruppe wurden getrennt berechnet, da die ADAMTS13KO-Mäuse während des Entblutens tendenziell empfindlicher reagieren und daher höhere Troponinwerte besitzen). Diese Werte werden in einem Großteil der anderen Versuche sowohl bei Wildtyp- als auch ADAMTS13KO-Mäusen überschritten (siehe Tabelle 12, Seite 79). In den Versuchen mit den Substanzen Gemcitabin und Ticlopidin bleiben die Wildtypgruppen unter dem Baseline-Wert und zeigen, dass diese Substanzen in unserer Arbeit keine schädigende Auswirkung auf das Herz hatten.

Im Menschen werden Werte von über 0,2 ng/ml Troponin zusammen mit LDH-Werten von über 1000 U/l mit einem Herzinfarkt assoziiert (Patschan et al., 2006). Diese Kombination findet sich bei den Versuchen mit 800 IE/kg rhVWF (Wildtyp und ADAMTS13KO), 500 IE/kg rhVWF (ADAMTS13KO), 50 mg/kg Histone (ADAMTS13KO), Quensyl<sup>®</sup> (ADAMTS13KO), Ticlopidin (ADAMTS13KO), Mitomycin (Wildtyp und ADAMTS13KO) wieder. Auch wenn die Werte von Menschen nicht direkt auf Mäuse übertragen werden können, können sie zumindest als Anhaltspunkt dienen und zeigen, dass die oben genannten Substanzen einen starken negativen Einfluss auf die Gesundheit der ADAMTS13-defizienten Mäuse haben.

Die Troponinwerte bei Gabe von 800 IE/kg rhVWF waren zwar bei den ADAMTS13KO-Mäusen im Mittel höher, aufgrund der starken Streuung innerhalb der Versuchsgruppe, ergab sich bei der Berechnung jedoch kein signifikanter Unterschied im t-Test. Wie in den Limitationen erwähnt, könnten die Schwankungen mit dem Verdünnungsgrad oder den Tauzyklen zusammenhängen. Wahrscheinlicher ist, dass die Schwankungen davon abhängen, ob die Mäuse einen Thrombus im Herzen besitzen. Nur die Tiere, welche einen Thrombus im Herzen gebildet haben, weisen auch erhöhte Troponinwerte auf. Auch wenn daher die Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren, können wir anhand der erhöhten Troponinwerte erkennen, dass es in der ADAMTS13KO-Gruppe vermehrt zu Thrombusbildung und Schäden im Herzen kommt.

Aufgrund unserer Ergebnisse können wir die Messung von cTnI bei Mäusen als eine neue und gute Möglichkeit eines diagnostischen und prognostischen Parameters in der TTP-Forschung empfehlen.

#### 4.11 LDH als Biomarker für die TTP

Für unsere Versuche wurde das Plasma der Mäuse auf die Aktivität von LDH im Zentrallabor der Unimedizin Mainz gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erwies sich als schwierig. Die Werte schwankten zwischen 11280 U/l und 120 U/l (vgl. Tabelle 15, Seite 117). Beispielhaft erkennbar ist eine signifikante Erhöhung der LDH-Werte bei den ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von 800 IE/kg rhVWF und 500 IE/kg rhVWF; die Werte betrugen dort im Durchschnitt  $3525 \pm 478,5$  U/l und  $2610 \pm 447,1$  U/l. Außerdem erhöht (aber nicht signifikant) waren die LDH-Werte in den ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von Ticlopidin und Quensyl®. In den übrigen Versuchen (250 IE/kg rhVWF, Gemcitabin, Mitomycin, Histone, und LPS) waren die Werte in beiden Gruppen vergleichbar hoch oder sogar höher in den Wildtyp-Mäusen. Für die Versuche mit Wilfactin und Kogenate® gab es nur jeweils zwei Werte pro Gruppe, die Ergebnisse sind daher nicht aussagekräftig. Auffallend sind die sehr hohen LDH-Werte nach Gabe von 50 mg/kg Histonen, welche zudem in den Wildtyp-Mäusen höher sind als in den ADAMTS13KO-Mäusen.

Auch bei TTP-Patientenproben ist bekannt, dass die LDH-Werte erheblich schwanken und daher die Aussagekraft des LDH-Werts nicht vergleichbar mit der Aussagekraft der Plättchenzahl ist. Die Schwankungen, bei den fraglichen Proben, könnten mit den bereits erwähnten Limitationen zusammenhängen.

In der Literatur findet man verschiedene Referenzwerte für LDH-Werte bei Mäusen ( $482,5 \pm 159,6$  und 300-400) (Wang et al., 2007; Yang et al., 2008). Die Werte, die man dort findet, unterscheiden sich stark voneinander, was möglicherweise von der jeweils eingesetzten Methode, dem Messgerät und wahrscheinlich dem jeweiligen Mausstamm abhängig ist. Die Messung des LDH-Werts hat in unseren Versuchen keine wegweisenden Befunde erbracht. Für weitere zukünftige Untersuchungen könnte man zum Beispiel den Haptoglobinwert, welcher ebenfalls Hämolyse misst, mit einem mausspezifischen Reagenz testen.

Tabelle 15: Übersicht der LDH-Werte (ns=nicht signifikant)

| Versuch               | Höchster Wert Wildtyp-Maus | Höchster Wert ADAMTS13KO-Maus | Mittelwert Wildtyp ( $\pm$ SEM) | Mittelwert ADAMTS13KO ( $\pm$ SEM) | Signifikanz |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 800 IE/kg             | 1316                       | 4120                          | 668.3 $\pm$ 326 n=3             | 3525 $\pm$ 478,5 n=3               | **          |
| 500 IE/kg             | 884                        | 3284                          | 556,7 $\pm$ 168,4               | 2610 $\pm$ 447,1 n=3               | *           |
| 250 IE/kg             | 2369                       | 1376                          | 1014 $\pm$ 678 n=3              | 737 $\pm$ 324 n=3                  | ns          |
| Gemcitabin +100vwf    | 1160                       | 892                           | 778 $\pm$ 141,6 n=5             | 653 $\pm$ 106,4 n=5                | ns          |
| Mitomycin             | 4912                       | 5184                          | 2028 $\pm$ 969 n=4              | 1833 $\pm$ 1136 n=4                | ns          |
| 50 mg Histone         | 11280                      | 9024                          | 6899 $\pm$ 3437 n=3             | 5731 $\pm$ 2439 n=3                | ns          |
| 25 mg Histone         | 884                        | 516                           | 631,7 $\pm$ 143,5               | 449 $\pm$ 33,53 n=3                | ns          |
| 2 mg LPS              | 740                        | 596                           | 494,3 $\pm$ 123,2               | 532,7 $\pm$ 57,44 n=3              | ns          |
| 1 mg LPS              | 653                        | 707                           | 499,7 $\pm$ 91,03               | 521,3 $\pm$ 108 n=3                | ns          |
| Quensyl <sup>®</sup>  | 960                        | 1427                          | 720 $\pm$ 161,4 n=3             | 1139 $\pm$ 143,9 n=3               | ns          |
| Ticlopidin            | 1380                       | 2476                          | 1152 $\pm$ 202,9 n=3            | 1843 $\pm$ 325,2 n=3               | ns          |
| Kogenate <sup>®</sup> | 1049                       | 876                           | 838,5 $\pm$ 210,5               | 778,0 $\pm$ 98                     | (n=2)       |
| Wilfactin             | 628                        | 408                           | 628 $\pm$ 0 n=2                 | 396 $\pm$ 12                       | (n=2)       |

#### 4.12 Die TTP, ein Zusammenspiel vieler Faktoren

**ADAMTS13-Defizienz, Endothelschäden, Aktivierung des Immunsystems und der Hämostase sowie genetische Defekte können eine Rolle bei der Entwicklung einer TTP spielen.**

Durch Studieren der Literatur und in unseren Versuchen erkennt man, dass die Entstehung einer TTP nicht von nur einem Faktor, etwa der ADAMTS13-Protease, abhängig ist. Eine Studie von Peyvandi et al. ergab, dass von 100 TTP-Patienten nur 48% an einer schweren Defizienz (< 10% ADAMTS13-Aktivität) und 24% an einer milden Defizienz litten (10-46% ADAMTS13-Aktivität). Eine normale ADAMTS13-Aktivität (> 46% Aktivität) fand man immerhin bei 28% der Patienten (Peyvandi et al., 2004). Umgekehrt gilt, dass nicht alle Patienten, die eine schwere ADAMTS13-Defizienz haben, wie zum Beispiel hereditäre TTP-Patienten, unter ständigen TTP-Schüben leiden. Die TTP ist, wie auch Peyvandi zeigte, nicht dringend von einer ADAMTS13-Defizienz abhängig. Daraus wird ersichtlich, dass eine ADAMTS13-Defizienz lediglich einen TTP-Schub begünstigt, dass aber zusätzlich weitere Faktoren eine Rolle bei der TTP spielen. Phillips et al. empfehlen bei einer ADAMTS13-Aktivität von über 10% und Anzeichen einer TMA, eine Untersuchung in Hinblick auf Gendefekte im Komplement durchzuführen (Phillips et al., 2016). Vieira-Martins publizierte 2016

eine Arbeit, die sich mit den genetischen Grundlagen der TMA befasst (Vieira-Martins et al., 2016). Sie zeigte, dass etliche Mutationen Einfluss auf eine TMA (in diesem Fall A-Hus) haben können.

#### Die Rolle von ADAMTS13 für die TTP

ADAMTS13 ist das Schlüsselenzym der TTP. Ist die Aktivität dieses Enzyms eingeschränkt oder gar völlig ausgeschaltet, kommt es unter gewissen Umständen zu den TTP-typischen Mikrothrombosen. Die soweit bekannt wichtigste Funktion von ADAMTS13 besteht in der Spaltung des VWF. Wie in unserer Arbeit gezeigt wurde, reagierten ADAMTS13KO-Mäuse auf die unterschiedlichen Trigger in der Regel empfindlicher als die Wildtyp-Kontrollgruppe. Die Ergebnisse bestätigten vorhergehende Publikationen und Arbeiten, welche beschreiben, dass ADAMTS13 durch die Spaltung des VWF eine antiinflammatorische und antithrombotische Wirkung im Körper hat und an der Regulierung von chronischer und akuter Entzündung beteiligt ist (Gandhi et al., 2011). Zum Beispiel zeigten de Meyer et al., dass ADAMTS13 einen schützenden antiinflammatorischen Effekt bei kardialen Ischämien hat. Durch die Spaltung des VWF verhindert ADAMTS13 eine übermäßige VWF-vermittelte Plättchen- oder Leukozyten-Rekrutierung im ischämischen Herzmuskel. In ADAMTS13-defizienten Mäusen hingegen konnte vermehrtes Leukozytenrollen beobachtet werden (De Meyer et al. 2012), was erklären könnte, warum wir in der Regel höhere Troponinwerte in den ADAMTS13KO-Mäusen finden.

#### Endothelschäden als wichtiger Faktor der TTP

Eine großflächige Schädigung des Endothels als mögliche Mitursache bei der TTP wurde schon 1936 in Betracht gezogen (Kwaan, 2005). Die vaskulären Endothelzellen spielen eine verbindende Rolle zwischen den Vorgängen der Hämostase, der Immunaktivierung (durch Infektionen und Entzündungen) und dem Komplementsystem. Die Verwicklung in diese bedeutenden Prozesse im Körper bietet eine Erklärung für die vielen verschiedenen Triggermöglichkeiten, welche zu demselben Krankheitsbild, der TTP, führen können. Verletzungen des Endothels aktivieren die Hämostase, insbesondere durch die erhöhte Freisetzung von UL-VWF-Multimeren und durch das freiliegende Kollagen, an welchem vermehrt plasmatischer VWF haftet. Dies führt letztendlich zur Aktivierung von Plättchen und der Bildung von Thromben. Schädigungen der Endothelzellen, etwa durch Chemotherapeutika, können zu einer endothelialen Dysfunktion, einer Freisetzung der vasodilatatorischen Nitritoxide (NO) und zu einer erhöhten Sekretion von tPA und Thrombomodulin führen (Thachil, 2007).

Herlitz et al. beschrieben bereits 1997 einen Zusammenhang zwischen erhöhten NO-Werten und TTP (Herlitz et al., 1997). Hoirisch-Clapauch et al. identifizierten den tPA als einen für

die TTP wichtigen Faktor (Hoirisch-Clapauch & Nardi, 2014). Wahrscheinlich ist die Erhöhung dieser Substanzen im Fall der TTP nicht als TTP-begünstigender Faktor, sondern vielmehr als Marker für eine starke Endothelschädigung zu sehen. Erhöhte NO- und tPA-Konzentrationen, welche bei einer TTP gemessen werden, bestätigen daher indirekt den Zusammenhang von Endothelschädigung und TTP.

#### Die Rolle von Infektionen bei der TTP

Häufig erleiden Patienten der hereditären TTP einen TTP-Schub nach einer Infektion. Dies bestätigten auch Morgand et al. in einer Studie mit 280 TTP-Patienten (Morgand et al., 2014). Sie fanden heraus, dass 41 % der Patienten vor oder während des TTP-Schubs an einer Infektion litten und diese in der Regel durch gramnegative Bakterien ausgelöst wurde.

Bei einer Infektion durch Fremdorganismen werden das Immunsystem und somit auch das Komplement aktiviert. Der körpereigene Schutzmechanismus reagiert mit der Ausscheidung von zytotoxischen Nukleosomen und Histonen, welche ihrerseits zu Gewebeschäden führen (Esmon et al., 2011). Die Endotoxine der Krankheitserreger aktivieren zusätzlich die Koagulation. Die Entzündungsfaktoren, TNF- $\alpha$  und IL8 stimulieren die Sekretion von VWF. In vitro konnte gezeigt werden, dass der Entzündungsfaktor IL6 außerdem die Spaltung der UL-VWF-Multimere inhibiert (Bernardo et al., 2004; Blake-Haskins et al., 2011). Hohe IL6 Konzentrationen werden auch bei Sepsis beobachtet und korrelieren mit einer niedrigen ADAMTS13-Aktivität und einer niedrigen Plättchenzahl (Nguyen et al., 2007). Die Folgen von Entzündungen können also krankhafte Bildungen von Mikrothrombosen sein, welche bei ADAMTS13-defizienten Patienten stärker ausfallen und zu den bekannten Symptomen der TTP führen können. In unserer Arbeit konnten wir nicht eindeutig zeigen, dass Histone und LPS in ADAMTS13-defizienten Mäusen starke Auswirkungen hatten. Chauhan machte mit LPS die gleiche Beobachtung (Chauhan et al., 2008). Möglicherweise spielt der Versuchsaufbau bei den Ergebnissen unserer Versuche eine Rolle. Da LPS Fieber und einen toxischen Schock auslöst, wurden die Mäuse schon 3-5 h nach Gabe von LPS geopfert und das Blut weiter auf die unterschiedlichen Parameter untersucht. Vielleicht würde man bei einer niedrigeren Dosierung über einen Zeitraum von mehreren Tagen andere Ergebnisse erzielen. Wahrscheinlich sind Histone und LPS bei der Entwicklung einer TTP durch Infektion nicht die ausschlaggebenden Faktoren; weiterhin anhaltende Berichte über Fälle von TTP und Infektionen (Riveiro-Barcela et al. 2018, Arapović et al. 2019, Andy Tang et al. 2018) zeigen jedoch den starken Zusammenhang

### Komplement: Beteiligung bei der TTP

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Die wichtigsten Aufgaben bestehen in der Abwehr von Fremdzellen, im Abbau von Immunkomplexen und in der Erkennung geschädigter Zellen (Noris & Remuzzi, 2013). Das Komplement kann über den klassischen-, den alternativen- und den Lectin-Weg aktiviert werden. Durch die Aktivierung des Protein-Kaskadensystems werden drei wichtige Effektoren des Immunsystems erzeugt: 1. proinflammatorische Anaphylatoxine (C3a und C5a), die Leukozyten aktivieren und an den Ort des Geschehens locken, 2. Opsonine (C3b, iC3b, and C3d), die den Abtransport und Abbau von Fremdorganismen und Immunkomplexen unterstützen und 3. Membranangriffskomplexe (C5b-9), welche die „Feindzelle“ angreifen und zerstören (Noris & Remuzzi, 2013).

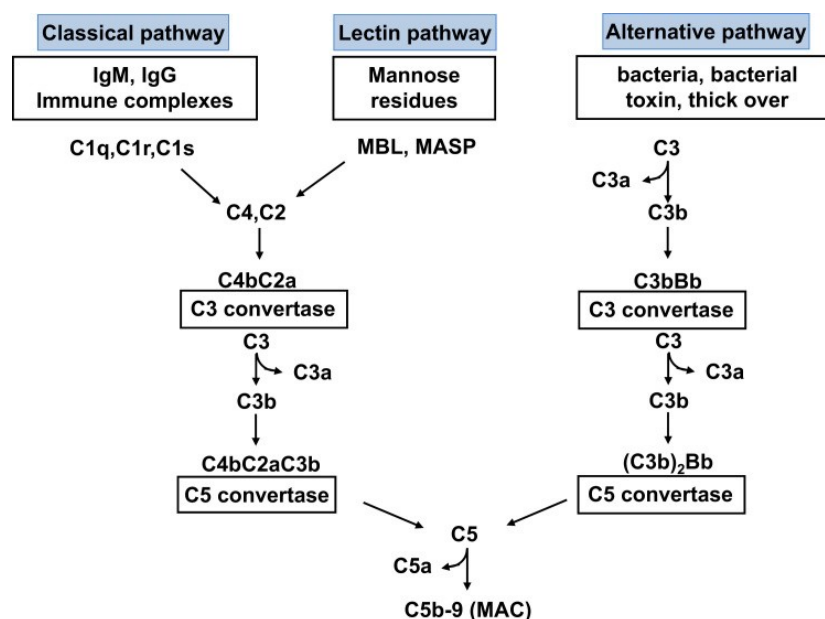


Abbildung 87: Das Komplementsystem nach Noris et al. (Noris & Remuzzi, 2013)

In den letzten Jahren wurde vermehrt die Bedeutung des Komplements bei der TTP erforscht. Komplement-Aktivierung sowie Mutationen im Komplementsystem sind in mehreren Arbeiten über die TTP beschrieben (Cao et al., 2008; Réti et al., 2012; Turner et al., 2015; Wu et al., 2013). Réti fand heraus, dass die Konzentration der Komplementfaktoren C3a und SC5b-9 während eines akuten Anfalls bei TTP-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen erhöht war, was auf eine Involvement des Komplements während eines Schubs deutet. Zusätzlich fanden sich bei 15% der Patienten verringerte Konzentrationen von C3 während eines Schubs, was auf einen Verbrauch von Komplement hinweist (Réti et al., 2012). Bei hereditäre TTP-Patienten mit Nierenproblemen konnte ausgeschlossen werden, dass diese mehrheitlich Mutationen im Komplement besitzen (Fan et al., 2016).

Turner et al. zeigten 2015, dass UL-VWF-Multimere, wie sie bei der TTP auftreten, nicht nur die Adhäsion und Aggregation der Plättchen initiieren, sondern auch den alternativen Weg im Komplement anregen. In vitro konnten sie belegen, dass sich C3b, die aktive Form von C3; an gebundene UL-VWF bindet und den Zusammenschluss der C3-Konvertase (C3bBb) und der C5-Konvertase (C3bBbC3b) auf den Strängen veranlasst. Dieser Mechanismus führt in vivo zur Bildung des terminalen Membranangriffskomplexes C5b-9 (Turner et al., 2015).

Westwood et al. beobachteten einen Zusammenhang von Anti-ADAMTS13-IgG-Subklassen und hohen Konzentrationen an C3a; Patienten mit den höchsten Konzentrationen an C3a, wiesen 3-4 IgG-Subklassen auf (Westwood et al. 2014). Sie zeigten außerdem, dass bei akuter TTP höhere Konzentrationen an IL6 und IL10 gemessen wurden als in Patienten in Remission.

Zusätzlich wurden auch Zusammenhänge zwischen dem Neutrophilen-Aktivierungsmarker Neutrophil Elastase (NE), der TTP und dem Komplement beschrieben. Mikes et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte NE-Konzentration im Plasma unmittelbar mit einer akuten TTP zusammenhängt. Sie folgerten, dass die erhöhte NE bei TTP-Patienten durch die Aktivierung der Neutrophilen und der Bildung von NETs entsteht (Mikes et al., 2014). NETs aktivieren das Komplement und umgekehrt aktiviert das Komplement Neutrophile, was zu einer positiven Rückkopplung führt (Leffler et al., 2012; Peng et al., 2009).

#### Genetische Veranlagung als Risikofaktor

Es ist anzunehmen, dass die genetische Veranlagung bei der TTP eine große Rolle einnimmt. Man kann von einer individuellen genetischen Prädisposition oder Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Triggern ausgehen, da nicht jede als Trigger bekannte Substanz in allen Patienten eine TTP auslöst.

Deutlich wird dies, wenn man die Vielzahl der verschiedenen Trigger betrachtet, die bei einem Teil der Patienten immer zu einem TTP-Schub führen können, bei dem anderen Teil der Patienten aber nie eine TTP auslösen. Auch die Tatsache, dass für Afrikaner eine höhere Wahrscheinlichkeit (neunmal höher!) besteht, an einer TTP zu erkranken, bestätigt eine gewisse genetische Disposition bei vielen TTP-Patienten. Genetische Polymorphismen findet man in der Bevölkerung häufig. Sie sind auch der Grund, warum Medikamente bei Patienten unterschiedlich wirken. Eine Studie über genetische Polymorphismen in Bezug auf Clopidogrel zum Beispiel publizierten Zhang et al. Sie zeigten, dass mit Clopidogrel behandelte Menschen aufgrund von einem Polymorphismus des CYP219 Gens unterschiedlich auf das Medikament reagierten (Zhang et al., 2017). Die Träger des CYP2C19\*2 oder \*3 Allels zeigten nach Gabe von Clopidogrel vor und nach einer perkutanen Koronarintervention eine stärkere Plättchenreaktivität, als beispielsweise Träger des CYP2C19\*0 Allels.

### Genetische Polymorphismen im Immunsystem: HLA Allele

HLAs (Human Leukocyte Antigens) sind wichtige Komponenten im Immunsystem, da sie bei der Erkennung körperfremder und körpereigener Zellen helfen. John et al. beschrieben einen Zusammenhang von HLA-Allelen und der TTP. Sie untersuchten eine Gruppe von Patienten mit erworbener TTP und zeigten, dass diese Gruppe signifikant höhere Zahlen der Allele HLA-DQB1\*02:02 und HLA-DRB1\*11 im Vergleich zur Kontrollgruppe besaßen und Träger dieser Allele daher ein höheres Risiko haben an einer idiopathischen TTP zu erkranken (John et al., 2012). Hrdinová et al. erwähnen zusätzlich, dass das HLA-DQB1\*03 Allel häufiger in TTP-Patienten zu finden ist (Hrdinová et al., 2018). Hingegen wurde das Allel HLA-DRB1\*04 bei TTP-Patienten seltener gefunden, was für eine „TTP-schützende“ Eigenschaft dieses Allels spricht (Hrdinová et al., 2018; John et al., 2012).

### Mutationen im ADAMTS13-Gen

Wie im Kapitel „1.3 Die Protease ADAMTS13“, Seite 12, beschrieben, wurden bei TTP-Patienten zahlreiche ADAMTS13-Mutationen gefunden. Die Mutationen führen entweder zu einer verminderten proteolytischen Fähigkeit von ADAMTS13 oder zu einem totalen Ausfall der Funktion von ADAMTS13. Mutationen im ADAMTS13-Gen sind für die hereditäre TTP typisch.

### Hämostatische Effektoren

Weitere, spekulative und teilweise in der Literatur erwähnte TTP-fördernde Mutationen oder Polymorphismen, könnten jene sein, welche eine Plättchenaktivierung oder -adhäsion begünstigen. So zum Beispiel Mutationen verschiedener Effektoren und Faktoren des Gerinnungssystems, wie Mutationen der Glykoproteine, des Thrombomodulins, des Prostacyclins aber auch des Endothels. Mutationen von Thrombomodulin wurden bereits in der Literatur mit aHUS in Verbindung gebracht (Delvaeye et al. 2009).

Mutationen der Rezeptoren GPVI und Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (auch GPIIb/IIIa genannt) könnten zum Beispiel zur TTP beitragen. Beide Rezeptoren haben Einfluss auf die direkte Interaktion von Kollagen und Plättchen. Polymorphismen von GPVI könnten auch eine erhöhte Thrombusformation bei hohem Scherstress bewirken (Best et al., 2003). Nach Dumont sind auch Blutungen bei Polymorphismen von GPVI zu beobachten (Dumont et al., 2015). Des Weiteren wären Mutationen im GPIIb/IIIa Komplex denkbar.

### Mutationen des Immunsystems: Komplement

Es gibt einige Publikationen, welche Mutationen im Komplement und ihren möglichen Einfluss auf die TTP beschreiben. 2016 berichteten Phillips et al. von Mutationen des Komplement-Inhibitors CD46 und des Faktor H-Gens bei TMA-Patienten. Faktor H hat einen regulie-

renden Einfluss auf das Komplementsystem und wirkt dadurch antiinflammatorisch. Rayes et al. beschrieben 2013, dass durch Bindung des Faktor H an den VWF, seine Kofaktor-Aktivität gegenüber der Faktor I vermittelten Herabregulation der Komplement-Aktivität verstärkt wird. Faktor H verhindert durch die Interaktion außerdem den Abbau des VWF durch ADAMTS13 und fördert die Plättchenaggregation (Rayes et al., 2014). Eine Mutation im Faktor H könnte daher die Entstehung einer TTP begünstigen (Phillips et al., 2016).

#### Komplexe Immunologische Reaktionen

Dong berichtete 2008 von einer TTP-Patientin, welche trotz täglichen Plasmaaustauschs verstarb. Die Plättchenzahl sank stetig und die Antikörper-Aktivität nahm im Laufe der Behandlung bis auf das 39-fache zu. Zu Beginn der Behandlung war eine hohe Titerzahl an IgG1-Antikörpern im Plasma der Patientin gefunden worden, welche sich im Verlauf der Krankheit verminderte und durch eine Erhöhung der Titerzahl an IgG2-Antikörpern ersetzt wurde. Dong et al. vermuten eine Aktivierung der Th1-Zytokin-Antwort und gehen von einer Verschärfung der TTP aufgrund komplexer immunologischer Reaktionen aus. Diese Verschärfung könnte auf somatische Hypermutation von B-Zellen oder die Bildung neuer B-Zellklone zurückgehen (Dong et al., 2008).

TTP-Patienten besitzen also häufig ungünstige Konstellationen von per se nicht lebensbedrohlichen genetischen Defekten oder Polymorphismen, die in Verbindung mit gewissen Triggersubstanzen einen TTP-Schub auslösen können. Zusätzlich leiden Patienten der erworbenen TTP häufig an einer genetischen Anfälligkeit für Autoimmunreaktionen (Mikes et al., 2014).

### 4.13 Ausblick: Neue Therapieansätze

Trotz Behandlung mit Plasmapherese, FFP und Corticosteroiden, sind 30-50% der Patienten schubgefährdet und erleiden mitunter eine Verschlimmerung der Symptome. Daher werden häufig Immunmodulatoren wie Rituximab und Glucocorticoide bei Patienten der erworbenen TTP verabreicht (Yates et al., 2014). Kopic et al. publizierten 2016 die Entwicklung einer rekombinanten humanen ADAMTS13-Protease mit dem Namen BAX930, welche von der Firma Baxter Innovations GmbH (jetzt Takeda, Stand 2019) durchgeführt wurde (Kopić et al., 2016; Plaimauer et al., 2015). BAX930 konnte bereits in einem TTP-Maus-Modell erfolgreich angewandt werden und verspricht bessere therapeutische Erfolge als die gängige Behandlung mit FFP bei Patienten der hereditären TTP. Die zusätzliche Gabe von ADAMTS13-Protease neutralisiert bei erworbener TTP die vorhandenen ADAMTS13-Antikörper während eines akuten Anfalls und führt wieder zu einer Erhöhung der ADAMTS13-Konzentration im Pati-

enten. (Kopić et al., 2016; Scully et al., 2017). Das neue Medikament befindet sich derzeit in Phase 3 einer klinischen Studie (Stand 2019). BAX930 würde für hereditäre TTP-Patienten, welche an häufigen TTP-Schüben leiden, eventuell die Möglichkeit der prophylaktischen und selbstständigen Behandlung eröffnen, wie es beispielsweise bei Diabetikern der Fall ist. Hereditäre TTP-Patienten leiden oft auch psychisch unter der Tatsache jederzeit einen plötzlichen TTP-Schub ausgeliefert zu sein. Eine prophylaktische Behandlung würde eine große Erleichterung bedeuten. Neben dieser aussichtsreichen Entwicklung gibt es weitere Ansätze für die Behandlung von TTP Patienten.

Yates et al. berichteten von einer Patientin mit erworbener TTP, die unter häufigen TTP-Schüben litt und welche sich trotz Behandlung mit gängigen Therapien nicht nachließen. Sie konnte mit Bortezomib, einem Proteasom-Inhibitor, welcher als Chemotherapeutikum angewandt wird, gut behandelt werden. Zudem verlängerten sich dadurch die schubfreien Intervalle bei der Patientin (Yates et al., 2014).

Die Arbeitsgruppe um Tersteeg, fand heraus, dass Plasmin, in Abwesenheit von ADAMTS13, UL-VWF spalten kann und die Bindung der Plättchen beeinflusst (Tersteeg et al., 2014). Tersteeg et al. empfehlen infolgedessen eine niedrige thrombolytische Therapie mittels Plasmin, welche auch effektiv eventuell vorhandene ADAMTS13-Antikörper umgehen könnte.

In Versuchen zeigten Feys et al., dass Plättchen-VWF-Komplexe durch den Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator an Endothelzellen degradiert werden (Feys et al., 2010). Plasminogen wird auf der aktivierten Endotheloberfläche exprimiert und hilft so beim Abbau des Mikrothrombus. Plasminogen-Aktivierung wurde bei akuten TTP-Patienten beobachtet. In vitro wurde gezeigt, dass Neutrophil Elastase, Thrombin und Granzym B den VWF ebenfalls degradieren können (Wohner et al., 2012).

Rekombinantes Thrombomodulin (rTM) wird derzeit zur Behandlung von DIC (disseminierte intravasale Koagulopathie) verwendet. Bei der DIC handelt sich um eine lebensbedrohliche Aktivierung der Blutgerinnung in mehreren Bereichen des Körpers, aufgrund von vaskulären Gewebeschäden. Unter anderem kommt es zur exzessiven Bildung von Fibringerinnsele und dem starken Verbrauch von Plättchen und weiteren Gerinnungsfaktoren (Levi et al., 2009; Venugopal, 2014). rTM kann sich positiv auf endotheliale Dysfunktion auswirken. Das Antikoagulans bindet Thrombin und vermittelt die Protein C Aktivierung, was letztendlich antifibrinolytisch, antikoagulatorisch und antiinflammatorisch auf die Gefäßwand wirkt (Martin et al., 2013). Da es viele Ähnlichkeiten zwischen DIC und TTP gibt (Reduktion der ADAMTS13-Aktivität, starker Verbrauch von Plättchen) untersuchten Nakamura et al., die Behandlung mit rTM bei erworbener TTP (Nakamura et al., 2016). Es konnte eine Erhöhung der

Plättchenzahl und eine allgemeine Verbesserung des Zustands der TTP Patienten beobachtet werden. Auch Nishijima et al. behandelten durch die Gabe von rekombinantem löslichen Thrombomodulin eine Gemcitabin-induzierte TTP erfolgreich (Nishijima et al., 2013). Für weitere haltbare Aussagen zur Anwendung von rTM bei der TTP müssten zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Aus der Forschung eröffnen sich weitere Therapieansätze. 2015 haben Zheng et al. mit Anfibatide, einem GPIIb-Antagonisten, ein weiteres mögliches Therapeutikum gegen die TTP beschrieben (Zheng et al., 2015). Anfibatide konnte im Versuch eine Botrocetin-induzierte Plättchenagglutinationen beinahe vollständig rückgängig machen. Zheng et al. vermuten daher, dass Anfibatide eine Plättchenagglutinationen auch während eines TTP-Schubs auflösen könnte. Peyvandi et al. veröffentlichten 2016 eine supportive Therapie durch Caplacizumab. Caplacizumab ist ein Anti-Von-Willebrand-Faktor Nanobody. Er verhindert die Bindung zwischen UL-VWF-Multimeren und Plättchen. In der Phase 2 Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Plättchenzahl bei mit Caplacizumab behandelten TTP-Patienten schneller normalisierte (Peyvandi et al., 2016).

Die Arbeitsgruppe um Jian stellte verschiedene ADAMTS13-Varianten her. Einige dieser Varianten waren resistent gegen ADAMTS13-Autoantikörper (Jian et al., 2012). Der Einsatz solcher ADAMTS13-Varianten wäre für die TTP-Behandlung der idiopathischen und erworbenen TTP, die immerhin bis zu 95 % der TTP-Fälle ausmachen, ein Meilenstein in der Behandlung.

Alle hier erwähnten Substanzen und Proteine könnten für die weitere TTP-Forschung von Interesse sein und sollten als zukünftige Therapiemöglichkeiten weiter erforscht werden.

## 5 Zusammenfassung/Abstract

Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) is a rare and severe haematological disorder. The absence of the VWF cleaving protease ADAMTS13 plays a key role in TTP. Despite this ADAMTS13 deficiency doesn't automatically constitute a TTP onset and it is still unknown what exactly triggers TTP. For this reason we tested a number of different substances in ADAMTS13KO-mice, a model for hereditary TTP, and studied their involvement in the development of TTP. The following substances were tested: recombinant VWF, plasmatic VWF (Wilfactin), plasmatic FVIII (Kogenate®), Hydroxychloroquine (Quensyl®), Ticlopidin (a Thienopyridine), Gemcitabine and Mitomycin (chemotherapeutics) and LPS and Histones. These substances are known to trigger TTP directly or indirectly. Since it is known that one of the first indicators for TTP onset in patients is platelet loss, we used this as the main criteria to define TTP onset in our mouse model. Mouse blood was tested for platelet loss, anemia and schistocytes before and after administration of the substances. Additionally, we measured LDH- and cardiac troponin I (cTnI) levels. After administration of rhVWF we observed that ADAMTS13KO-mice reacted with a stronger platelet loss and generally higher troponin levels than wildtype mice. Plasmatic FVIII and VWF did not have any effects on the mice. LPS und Histones, substances which typically also contribute to infection and inflammation, did not explicitly show stronger effects in ADAMTS13KO-mice. This brought us to the conclusion that Histones and LPS don't play an important direct role in infection- and inflammation-associated-TTP. ADAMTS13KO-mice hinted at a higher sensitivity towards Hydroxychloroquine and Ticlopidine probably due to their toxic effect on endothelia.

When treated with Gemcitabine, mice of both groups reacted with heavy platelet loss and troponin levels were very high in ADAMTS13KO-mice. After administration of Mitomycin high levels of LDH were found in both groups and a higher platelet loss was observed in ADAMTS13KO-mice. The results of Gemcitabine and Mitomycin can also be attributed to a high cell toxicity and endothelial damage.

We conclude that most of these substances induce endothelial damage, which leads to a pro-thrombotic state and can trigger TTP in hereditary TTP-patients. Endothelial damage causes higher secretion of VWF, which if not cleaved by ADAMTS13, will form highly adhesive prothrombotic and proinflammatory strings. This explains the higher sensitivity of ADAMTS13KO-mice towards the tested substances. Authentic replication of human TTP in mice seems difficult, as shown in other studies, yet our results imply that measuring platelet loss and cTnI levels are important and reliable markers for TTP research in mice. Through reviewing literature and by taking our results into account, we conclude that the onset of TTP in patients develops through complex interactions between genetic mutations, activation of the immune system, activation of hemostasis and endothelial damage.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achuthan, S., Ahluwalia, J., Shafiq, N., Bhalla, A., Pareek, A., Chandurkar, N., & Malhotra, S. (2015). Hydroxychloroquine's Efficacy as an Antiplatelet Agent Study in Healthy Volunteers: A Proof of Concept Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 20(2), 174–80.
- Ahmed, F., Sumalnop, V., Spain, D. M., & Tobin, M. S. (1978). Thrombohemolytic thrombocytopenic purpura during penicillamine therapy. *Archives of internal medicine*, 138(8), 1292–1293.
- Akbayram, S., Dogan, M., Peker, E., Akgun, C., Oner, A. F., & Caksen, H. (2011). Thrombotic thrombocytopenic purpura in a case of brucellosis. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 17(3), 245–247.
- Albaramki, J. H., Teo, J., & Alexander, S. I. (2009). Rituximab therapy in two children with autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatric Nephrology*, 24(9), 1749–1752.
- Alberts, S. R., Townley, P. M., Goldberg, R. M., Cha, S. S., Sargent, D. J., Moore, D. F., Mailliard, J. A. (2003). Gemcitabine and oxaliplatin for metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *Ann.Oncol.*, 14(4), 580–585.
- Alcazar-Guijo, J., Jimenez-Saenz, M., Gomez-Parra, M., & Herrerias-Gutierrez, J. M. (2005, August). Acute pancreatitis, incomplete thrombotic microangiopathy and cocaine abuse: an unusual pathogenic link. *Intensive care medicine*. United States, 31(8), 1148.
- Alexopoulou, A., Dourakis, S. P., & Kaloterakis, A. (2002, September). Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient treated with clarithromycin. *European journal of haematology*. England, 69(3), 191-192.
- Algra, A., & van Gijn, J. (2000). Is clopidogrel superior to aspirin in secondary prevention of vascular disease? *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*, 1(3)(143–145).
- Allam, R., Kumar, S. V, Darisipudi, M. N., & Anders, H. J. (2014). Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med (Berl)*, 92(5), 465–472.
- Allan, D. S., Thompson, C. M., Barr, R. M., Clark, W. F., & Chin-Yee, I. H. (2002). Ciprofloxacin-associated hemolytic-uremic syndrome. *The Annals of pharmacotherapy*, 36(6), 1000–1002.
- Allford, S. L., Bird, J. M., & Marks, D. I. (2002). Thrombotic thrombocytopenic purpura following stem cell transplantation. *Leukemia & lymphoma*, 43(10), 1921–6.
- Alwan, F., Vendramin, C., Vanhoorelbeke, K., Langley, K., McDonald, V., Austin, S., Scully, M. (2017). Presenting ADAMTS13 antibody and antigen levels predict prognosis in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 130(4), 466–471.
- Amjad, A. I., & Parikh, R. A. (2013). Opana-ER used the wrong way: intravenous abuse leading to microangiopathic hemolysis and a TTP-like syndrome. *Blood*, 122(20), 3403.
- Ammollo, C. T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *JTH*, 9(9), 1795–1803.

- Ammollo, C. T., Semeraro, N., Carratu, M. R., Colucci, M., & Semeraro, F. (2015). Histones differentially modulate the anticoagulant and profibrinolytic activities of heparin, heparin derivatives and dabigatran. *J Pharmacol Exp Ther*, 356(2), 305-313.
- Amorosi, E., & Ultmann, J. (1965). Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Report of 16 Cases and Review of the Literature. *Medicine*, 45(2), 139-159.
- Andrews, R. K., & Berndt, M. C. (2008). Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest*, 118(9), 3009–3011.
- Anton Vazquez, V., Pascual, L., Corominas, H., & Gimenez Torrecilla, I. (2017). Relapsed hydroxychloroquine induced thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus patient. *Reumatologia clinica*, 13(5), 294-296.
- Andy Tang SO, Leong, Ruixin T, Chua HH, Chew (2018). Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndrome associated with arcanobacterium pyogenes endocarditis in a post-transplant patient: A case report. *Medical Journal of Malaysia*, 73(5), 344-346.
- Arapović, A., Prgomet, S., Saraga, M., Kovačević, T., Prohászka, Z., Despot, R., Radić, J. (2019). Association of Appendicitis, Helicobacter Pylori Positive Gastritis and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in an Adolescent. *The American journal of case reports*, 20, 131–133.
- Arditi, M., Zhou, J., Dorio, R., Rong, G., Goyert, S. M., & Kim, K. (1993). Endotoxin-Mediated Endothelial Cell Injury and Activation : Role of Soluble CD14, 61(8), 3149–3156.
- Asada, Y., Sumiyoshi, A., Hayashi, T., Suzumiya, J., & Kaketani, K. (1985). Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thrombosis Research*, 38(5), 469–479.
- Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. W., Nestel, F. P., ... Semple, J. W. (2006). Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*, 107(2), 637–641.
- Ault, K. A., & Knowles, C. (1995). In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Experimental hematology*, 23(9), 996–1001.
- Babu K, G., & Bhat, G. R. (2016). Cancer-associated thrombotic microangiopathy. *Ecancermedicalscience*, 10, 1–11.
- Babuin, L., & Jaffe, A. S. (2005). Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*, 173(10), 1191–1202.
- Baliga, R., & Wingo, C. (2003). Quinine Induced HUS-TTP: An Unusual Presentation. *Am J Med Sci*, 326(6), 378–80.
- Bandow, K., Kusuyama, J., Shamoto, M., Kakimoto, K., Ohnishi, T., & Matsuguchi, T. (2012). LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. *FEBS Letters*, 586(10), 1540–1546.
- Banno, F., Kaminaka, K., Soejima, K., Kokame, K., & Miyata, T. (2004). Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *JBC*, 279(29), 30896–30903.

- Banno, F., Kokame, K., Okuda, T., Honda, S., Miyata, S., Kato, H., Tomiyama, Y., Miyata, T. (2006). Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 107(8), 3161–3166.
- Bapani, S., Epperla, N., Kasirye, Y., Mercier, R., & Garcia-Montilla, R. (2013). ADAMTS13 deficiency and thrombotic thrombocytopenic purpura associated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical medicine & research*, 11(2), 86–90.
- Bar Meir, E., Amital, H., Levy, Y., Kneller, A., Bar-Dayana, Y., & Shoenfeld, Y. (2000). Mycoplasma-pneumoniae-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta haematologica*, 103(2), 112–115.
- Baron, B. W., van Besien, K., Hoffman, P. C., Kohn, O. F., Rossof, A. H., & Baron, J. M. (2003). Thrombotic thrombocytopenic purpura after cephalosporin administration: a possible relationship. *Transfusion*, 43(9), 1317–1321.
- Barr, E., Douglas, J. F., & Hill, C. M. (1990). Recurrent acute hypersensitivity to quinine. *BMJ*, 301(6747), 323.
- Basic-Jukic, N., Juric, I., Brunetta-Gavranic, B., Kes, P., Bubic-Filipi, L., & Glavas-Boras, S. (2008). [Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 62 Suppl 1, 93–96.
- Bayraktar, S., Eileen, B., Shariatmadar, S., & Lian, E. (2010). Concurrent thrombotic thrombocytopenic purpura and immune thrombocytopenic purpura in a patient with metastatic neuroendocrine tumour successfully treated with rituximab-CVP. *BMJ case reports*, published online 2010.
- Beaulieu, L. M., & Freedman, J. E. (2011). Inflammation & the platelet histone trap. *Blood*, 118(7), 1714–1715.
- Bell, M. D., Barnhart Jr., J. S., & Martin, J. M. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura causing sudden, unexpected death--a series of eight patients. *J Forensic Sci*, 35(3), 601–613.
- Bell, W. R., Braine, H. G., Ness, P. M., & Kickler, T. S. (1991). Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med*, 325(6), 398–403.
- Benhamou, Y., Boelle, P. Y., Baudin, B., Ederhy, S., Gras, J., Galicier, L., Coppo, P. (2015). Cardiac troponin-i on diagnosis predicts early death and refractoriness in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. experience of the french thrombotic microangiopathies reference center. *JTH*, 13(2), 293–302.
- Benmoussa, J., Chevenon, M., Nandi, M., Forlenza, T. J., & Nfonoyim, J. (2016). Ibuprofen-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Emerg Med*, 34(5), 942.e5-7.
- Bennett, C., Connors, J. M., Carwile, J. M., Moake, J. L., Bell, W. R., Tarantolo, S. R., ... Tsai, H. M. (2000). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med*, 342(24), 1773–1777.
- Bennett, C., Davidson, C. J., Raisch, D. W., Weinberg, P. D., Bennett, R. H., & Feldman, M. D. (1999). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Archives of Internal Medicine*, 159(21), 2524–2528.
- Bennett, C., Jacob, S., Dunn, B. L., Georgantopoulos, P., Zheng, X. L., Kwaan, H. C., ...

- Fujimura, Y. (2013, June). Ticlopidine-associated ADAMTS13 activity deficient thrombotic thrombocytopenic purpura in 22 persons in Japan: a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). *Br J Haematol*. England, 161(6), 896-898.
- Bennett, C., Kim, B., Zakarija, A., Bandarenko, N., Pandey, D. K., Buffie, C. G., ... Fujimura, Y. (2007). Two Mechanistic Pathways for Thienopyridine-Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. A Report From the SERF-TTP Research Group and the RADAR Project. *JACC*, 50(12), 1138-1143.
- Bennett, C., Weinberg, P. D., Rozenberg-Ben-Dror, K., Yarnold, P. R., Kwaan, H. C., & Green, D. (1998). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. A review of 60 cases. *Ann Intern Med*, 128(7), 541-544.
- Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Choi, H., Moake, J. L., & Dong, J. F. (2005). Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *JTH*, 3(3), 562-570.
- Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J. F., & Dong, J. F. (2004). Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand-factor multimers under flow. *Blood*, 104(1), 100-106.
- Best, D., Senis, Y. A., Jarvis, G. E., Eagleton, H. J., Roberts, D. J., Saito, T., ... Watson, S. P. (2003). GPVI levels in platelets: Relationship to platelet function at high shear. *Blood*, 102(8), 2811-2818.
- Bettoni, G., Palla, R., Valsecchi, C., Consonni, D., Lotta, L. A., Trisolini, S. M., ... Peyvandi, F. (2012). ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10(8), 1556-1565.
- Blake-Haskins, J. A., Lechleider, R. J., & Kreitman, R. J. (2011). Thrombotic microangiopathy with targeted cancer agents. *C*, 17(18), 5858-5866.
- Blazes, D. L., & Decker, C. F. (2004). Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in HIV-Infected Patients. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 12(2), 99-106.
- Boctor, F. N., Chiose, I., & Bradley, T. (2013). Thrombotic thrombocytopenic purpura with unusual 33 recurrences: a case report. *Annals of clinical and laboratory science*, 43(1), 91-93.
- Bondeson, J., & Berglund, S. (1991). Diclofenac-induced thrombocytopenic purpura with renal and hepatic involvement. *Journal of internal medicine*, 230(6), 543-547.
- Booth, K., Terrell, D. R., Vesely, S., & George, J. N. (2012). Systemic infections mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 86(9), 743-751.
- Borghardt, E. J., Kirchertz, E. J., Marten, I., & Fenchel, K. (1998). Protein A-immunoadsorption in chemotherapy associated hemolytic-uremic syndrome. *Transfusion science*, 19 Suppl, 5-7.
- Borthakur, G., Cruz, M. A., Dong, J. F., McIntire, L., Li, F., López, J. A., & Thiagarajan, P. (2003). Sulfatides inhibit platelet adhesion to von Willebrand factor in flowing blood. *JTH*, 1(6), 1288-1295.
- Bougie, D. W., Peterson, J., Rasmussen, M., & Aster, R. H. (2016). Mechanism of quinine-dependent monoclonal antibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIIa. *Blood*, 126(18), 2146-2153.

- Bray, V. J., West, S. G., & Kristo, D. A. (1994). Simultaneous presentation of thrombotic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *South Med J*, 87(8), 827–830.
- Brichacek, M., Blake, P., & Kao, R. (2012). Capnocytophaga canimorsus infection presenting with complete splenic infarction and thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report. *BMC research notes*, 5, 695.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
- Bukowski, R. (1985). Plasma exchange in the thrombotic microangiopathies. *J Clin Apher*, 2(4), 282–286.
- Byrnes, J. J., Baquerizo, H., Gonzalez, M., & Hensely, G. T. (1986). Thrombotic thrombocytopenic purpura subsequent to acute myelogenous leukemia chemotherapy. *Am J Hematol*, 21(3), 299–304.
- Cantrell, J. E., Phillips, T. M., & Schein, P. S. (1985). Carcinoma-associated hemolytic-uremic syndrome: A complication of mitomycin C chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 3(5), 723–734.
- Cao, W., Niiya, M., Zheng, X., Shang, D., & Zheng, X. L. (2008). Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *JTH*, 6(7), 1233–1235.
- Casari, C., Lenting, P. J., Wohner, N., Christophe, O. D., & Denis, C. V. (2013). Clearance of von Willebrand factor. *JTH*, 11(SUPPL.1), 202–211.
- Catizone, L., Santoro, A., Scialfa, G., Cagnoli, L., & Fabbri, L. (1974). Thrombotic thrombocytopenic purpura due to administration of Ibuprofen. *Minerva nefrologica*, 21(6), 439–444.
- Cattell, V. (1985). Mitomycin-induced hemolytic uremic kidney. An experimental model in the rat. *The American journal of pathology*, 121(1), 88–95.
- Ceunynck, K. De, Meyer, S. F. De, & Vanhoorelbeke, K. (2012). Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle, *Blood*, 121(2), 270–278.
- Chak, W. K., Lam, D. S. Y., Lo, W. H., Hui, C. M., & Wong, S. N. (2003). Thrombotic thrombocytopenic purpura as a rare complication in childhood systemic lupus erythematosus: case report and literature review. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine*, 9(5), 363–8.
- Chang, T. R., Albright, K. C., Boehme, A. K., Dorsey, A., Sartor, E. A., Kruse-Jarres, R., ... Martin-Schild, S. (2014). Factor VIII in the setting of acute ischemic stroke among patients with suspected hypercoagulable state. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis*, 20(2), 124–8.
- Chauhan, A. K., Walsh, M. T., Zhu, G., Ginsburg, D., Wagner, D. D., & Motto, D. G. (2008). The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood*, 111(7), 3452–3457.
- Cheah, C. Y., De Keulenaer, B., & Leahy, M. F. (2009). Fluoroquinolone-induced immune thrombocytopenia: a report and review. *Internal medicine journal*, 39(9), 619–623.
- Chen, D. K., Kim, J. S., & Sutton, D. M. (1999). Thrombotic thrombocytopenic purpura

- associated with ticlopidine use: a report of 3 cases and review of the literature. *Arch Intern Med*, 159(3), 311–314.
- Choi, M. K., Hong, J. Y., Jang, J. H., & Lim, H. Y. (2008). TTP-HUS associated with sunitinib. *Cancer Res Treat*, 40(4), 211–213.
- Citarrella, P., Gebbia, V., Teresi, M., Miceli, S., Sciortino, G., Vaglica, M., ... Palmeri, S. (2002). Hemolytic uremic syndrome after chemotherapy with gemcitabine and taxotere: a case report. *Anticancer research*, 22(2B), 1183–1185.
- Clifton, L. a., Skoda, M. W., Daulton, E. L., Hughes, a. V., Le Brun, a. P., Lakey, J. H., & Holt, S. a. (2013). Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(89)
- Coppo, P., Adrie, C., Azoulay, E., Leleu, G., Oksenhendler, E., Galicier, L., ... Schlemmer, B. (2003). Infectious diseases as a trigger in thrombotic microangiopathies in intensive care unit (ICU) patients? *Intensive care medicine*, 29(4), 564–569.
- Coppola B. (2005). Thrombozytenfunktion unter Einfluß der antithrombozytären Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel. *unv. Dissertation, Technische Universität München*.
- Corash, L., & Levin, J. (1990). The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volume in normal and thrombocytopenic C3H mice. *Experimental hematology*, 18(9), 985–989.
- Crawley, J., & Scully, M. (2013). Thrombotic thrombocytopenic purpura: basic pathophysiology and therapeutic strategies. *American Society of Hematology. Education Program*, 2013(1), 292–299.
- Crawley, J., De Groot, R., & Luken, B. M. (2009). Circulating ADAMTS-13-von Willebrand factor complexes: An enzyme on demand. *JTH*, 7(12), 2085–2087.
- Crew, R. J., Radhakrishnan, J., Cohen, D. J., Stern, L., Goldstein, M., Hardy, M., ... Markowitz, G. S. (2005). De novo thrombotic microangiopathy following treatment with sirolimus: report of two cases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 20(1), 203–209.
- Crum, N. F., & Gable, P. (2000). Quinine-Induced Hemolytic-Uremic Syndrome. *Southern Medical Journal*, 93(7), 726–728.
- Cruz, M. A., Yuan, H., Lee, J. R., Wise, R. J., & Handin, R. I. (1995, August). Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides. *JBC*, 270(33) 10822-10827
- De Ceunynck, K., De Meyer, S. F., & Vanhoorelbeke, K. (2013). Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood*, 121(2), 270–277.
- de Man, A. M., Smulders, Y. M., Roozendaal, K. J., & Frissen, P. H. (1997). HIV-related thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 2 cases and a review of the literature. *The Netherlands journal of medicine*, 51(3), 103–109.
- De Meyer, S., Budde, U., Deckmyn, H., & Vanhoorelbeke, K. (2011). In vivo von Willebrand factor size heterogeneity in spite of the clinical deficiency of ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 9(12), 2506–2508.

- De Smet, D., Jochmans, K., & Neyns, B. (2008). Development of thrombotic thrombocytopenic purpura after a single dose of gemcitabine. *Ann Hematol*, 87(6), 495–496.
- Deepanjali, S., Naik, R. R., Mailankody, S., Kalaimani, S., & Kadiravan, T. (2015, November). Dengue Virus Infection Triggering Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 1028–1030.
- Deford, C. C., Reese, J. A., Schwartz, L. H., Perdue, J. J., Kremer Hovinga, J. A., Lämmle, B., ... George, J. N. (2013). Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 122(12), 2023–2029.
- Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM (2009). Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*; 361(4), 345–357.
- Demir, D., Öcal, F., Abanoz, M., & Dermenci, H. (2014). A case of thrombocytopenia associated with the use of hydroxychloroquine following open heart surgery. *International Journal of Surgery Case Reports*, 5(12), 1282–1284.
- Dent, J. a, Berkowitz, S. D., Ware, J., Kasper, C. K., & Ruggeri, Z. M. (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6306–6310.
- Deutsch, M., Manesis, E. K., Hadziyannis, E., Archimandritis, A. J., Deutsch, M., Manesis, E. K., ... Archimandritis, A. J. (2009). Thrombotic thrombocytopenic purpura with fatal outcome in a patient with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-a / 2b. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(3), 408–409.
- Ding, L., Qian, C., Zhang, Y. H., & Wu, T. Q. (2016). Hepatitis B complicated with thrombotic thrombocytopenic purpura after interferon treatment: a case report. *Zhonghua xue ye xue za zhi*, 37(12), 1037.
- Dong, L., Chandrasekaran, V., Zhou, W., & Tsai, H. M. (2008). Evolution of ADAMTS13 antibodies in a fatal case of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 83(10), 815–817.
- Dumont, J. A., Loveday, K. S., Light, D. R., Pierce, G. F., & Jiang, H. (2015). Evaluation of the toxicology and pharmacokinetics of recombinant factor VIII Fc fusion protein in animals. *Thrombosis Research*, 136(6), 1266–1272.
- Duperray, A., Tranqui, L., Alix, J. L., & Cordonnier, D. (1988). Effect of mitomycin C on prostacyclin synthesis by human endothelial cells. *Biochemical pharmacology*, 37(24), 4753–4757.
- Ebner, K. J. (2015). Untersuchungen zu Triggerfaktoren der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) in Mäusen. *VVB Laufersweiler Verlag, Giessen*.
- Edwards, M. H., Pierangeli, S., Liu, X., Barker, J. H., Anderson, G., & Harris, E. N. (1997). Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation*, 96(12), 4380–4384.
- El-Ghazal, R., Podoltsev, N., Marks, P., Chu, E., & Saif, M. W. (2011). Mitomycin-;C-

- Induced thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome: cumulative toxicity of an old drug in a new era. *Clinical Colorectal Cancer*, 10(2), 142–145.
- Erdem, F., Kiki, I., Gundogdu, M., & Kaya, H. (2007). Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with Brucella infection is highly responsive to combined plasma infusion and antimicrobial therapy. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 16(4), 324–326.
- Esmon, C. T. (2003). The protein C pathway. *Chest*, 124(3 Suppl), 26S–32S.
- Esmon, C. T., Xu, J., & Lupu, F. (2011). Innate immunity and coagulation. *JTH*, 9(1 S), 182–188.
- Eyzaguirre, A. E., Love, R. B., Hargate, D. A., & Schilz, R. (2017). Sirolimus-associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP): Report of three cases and review of the literature. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 24(2), 167.
- Fachinformation Kogenate (2017). Fachinformation: Kogenate® Bayer. 500 I.E. Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung *Fachinformation*, November(Bayer Vital GmbH), Zulassungsnummer EU/1/00/143/011.
- Fachinformation Gemcitabin (2015). Fachinformation: Gemcitabin/HAEMATO 200 mg. *Fachinformation*, Februar(HAEMATO PHARM GmbH), Zulassungsnummer 68526.00.00.
- Fachinformation Mitomycin (2016). Fachinformation Mitomycin 2 medac. *Fachinformation*, November(medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH), Zulassungsnummer 394.00.00.
- Fachinformation Quensyl® (2018). Fachinformation: Quensyl®. *Fachinformation*, Februar (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH), Zulassungsnummer 6584604.00.00.
- Fachinformation Ticlopidin (2016). Fachinformation: Ticlopidin-CT 250 mg Filmtabletten. *Fachinformation*, April(AbZ-Pharma GmbH), Zulassungsnummer 43174.00.00.
- Fahal, I. H., Williams, P. S., Clark, R. E., & Bell, G. M. (1992). Thrombotic thrombocytopenic purpura due to rifampicin. *BMJ (Clinical research ed.)*, 304(6831), 882.
- Falter, T., Alber, K. J., & Scharer, I. (2013). Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombo cytopenic purpura episodes. *Hamostaseologie*, 33(2), 113–120.
- Fan, X., Kremer Hovinga, J. A., Shirotani-Ikejima, H., Eura, Y., Hirai, H., Honda, S., Miyata, T. (2016). Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. *International Journal of Hematology*, 103(3), 283–291.
- Ferrari, S., Mudde, G. C., Rieger, M., Veyradier, A., Kremer Hovinga, J. A., & Scheifflinger, F. (2009). IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *JTH*, 7(10), 1703–1710.
- Feys, H. B., Anderson, P. J., Vanhoorelbeke, K., Majerus, E. M., & Sadler, J. E. (2009). Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 7(12), 2088–2095.
- Feys, H. B., Deckmyn, H., & Vanhoorelbeke, K. (2009). ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematologica*, 121(2-3), 183–185.

- Feys, H. B., Vandeputte, N., Palla, R., Peyvandi, F., Peerlinck, K., Deckmyn, H., ... Vanhoorelbeke, K. (2010). Inactivation of ADAMTS13 by plasmin as a potential cause of thrombotic thrombocytopenic purpura. *JTH*, 8(9), 2053–2062.
- Fiaccadori, E., Maggiore, U., Rotelli, C., Giacosa, R., Parenti, E., Cabassi, A., ... Wirote, L. (2006). Thrombotic-thrombocytopenic purpura following malaria prophylaxis with mefloquine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 160–161.
- Finn, M., Dale, B., & Isles, C. (1996). Beware of the dog! A syndrome resembling thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Capnocytophaga canimorsus septicemia. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 11(9), 1839–1840.
- Frangie, C., Lefaucheur, C., Medioni, J., Jacquot, C., Hill, G. S., & Nochy, D. (2007). Renal thrombotic microangiopathy caused by anti-VEGF-antibody treatment for metastatic renal-cell carcinoma. *The Lancet. Oncology*, 8(2), 177–178.
- Fraser, J. L., Millenson, M., Malynn, E. R., Uhl, L., & Kruskall, M. S. (1996). Possible association between the Norplant contraceptive system and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Obstetrics and gynecology*, 87(5 Pt 2), 860–863.
- Fromm, L. (2017). Suspected hydroxychloroquine-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 48(1), 72–75.
- Fuchs, T. A., Bhandari, A. A., & Wagner, D. D. (2011). Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*, 118(13), 3708–3714.
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., ... Wagner, D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15880–15885.
- Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777–1783.
- Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., & Chung, D. (2001). Plenary paper Purification of human von Willebrand factor – cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98(6), 1662–1666.
- Fujimura, Y., Matsumoto, M., Isonishi, A., Yagi, H., Kokame, K., Soejima, K., ... Miyata, T. (2011). Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1, 283–301.
- Fujita, H., Takemura, S., Hyo, R., Tanaka, M., Koharazawa, H., Fujisawa, S., ... Ishigatsubo, Y. (2003). Pulmonary embolism and thrombotic thrombocytopenic purpura in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid. *Leukemia & lymphoma*, 44(9), 1627–1629.
- Fukusako, T., Yamashita, H., Omoto, M., Matsuda, K., Shinohara, K., & Fujimura, Y. (2007). A Case of thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*, 47(10), 635–638.
- Fung, M. C., Storniolo, A. M., Nguyen, B., Arning, M., Brookfield, W., & Vigil, J. (1999). A review of hemolytic uremic syndrome in patients treated with gemcitabine therapy. *Cancer*, 85(9), 2023–2032.
- Furlan, B. M., Robles, R., Solenthaler, M., Wassmer, M., Sandoz, P., & La, B. (1997).

- Deficient Activity of von Willebrand Factor – Cleaving Protease in Chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*, 89(9), 3097–3103.
- Furlan, M. (2003). Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 1(2), 243–255.
- Furlan, M., Robles, R., & Lämmle, B. (1996). Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87(10), 4223–34.
- Gachet, C. (2001). ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemos*, 86(1), 222–232.
- Gachet, C., Stierle, A., Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Lanza, F., Bouloux, C., & Maffrand, J. P. (1990). The thienopyridine PCR 4099 selectively inhibits ADP-induced platelet aggregation and fibrinogen binding without modifying the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex in rat and in man. *Biochemical pharmacology*, 40(2), 229–238.
- Galbusera, M., Noris, M., & Remuzzi, G. (2009). Inherited thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 94(2), 166–170.
- Galesic, K., Bozic, B., Racic, I., & Scukanec-Spoljar, M. (2006). Thrombotic microangiopathy associated with alpha-interferon therapy for chronic myeloid leukaemia. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 11(1), 49–52.
- Gandhi, C., Khan, M. M., Lentz, S. R., & Chauhan, A. K. (2011). ADAMTS13 reduces vascular inflammation and the development of early atherosclerosis in mice. *Blood*, 119(10), 2385–2391.
- Gandhi, K., Aronow, W. S., Desai, H., Amin, H., Sharma, M., Lai, H. M., & Singh, P. (2010). Cardiovascular manifestations in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: A single-center experience. *Clinical Cardiology*, 33(4), 213–216.
- Gardner, G., Mesler, D., & Gitelman, H. J. (1989). Hemolytic uremic syndrome following cisplatin, bleomycin, and vincristine chemotherapy: a report of a case and a review of the literature. *Renal failure*, 11(2–3), 133–137.
- Gawaz, M. (1999). Das Blutplättchen. *Georg Thieme Verlag*.
- Gent, M., Blakely, J. A., Easton, J. D., Ellis, D. J., Hachinski, V. C., Harbison, J. W., ... Turpie, A. G. (1989). The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet*, 1(8649), 1215–1220.
- George, J. N. (2010). How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood*, 116(20), 4060–4069.
- George, J. N., Morton, J. M., Liles, N. W., & Nester, C. M. (2017). After the Party's Over. *N Engl J Med*, 376(1), 74–80.
- George, J. N., Nester, C. M., & McIntosh, J. J. (2015). Syndromes of thrombotic microangiopathy associated with pregnancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015(2015), 644–648.
- George, J. N., Terrell, D., Swisher, K., & Vesely, S. (2008). Lessons learned from the Oklahoma thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome registry. *Journal of clinical apheresis*, 23(4), 129–137.
- Gerischer, L. M., Siebert, E., Janke, O., Jungehuelsing, G. J., & Ruprecht, K. (2016).

- Favorable outcome of interferon-beta associated thrombotic microangiopathy following treatment with corticosteroids, plasma exchange and rituximab: A case report. *Multiple sclerosis and related disorders*, 10(November 2016), 63–65.
- Gerritsen, H. E., Robles, R., Lämmle, B., & Furlan, M. (2001). Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*, 98(6), 1654–1661.
- Geys, Roose, & Scroyen. (2015). Obesity as a risk factor for the development of thrombotic thrombocytopenic purpura in ADAMTS13 deficient mice. *ISTH 2015, PO571–TUE*.
- Gill, J. C., Castaman, G., Windyga, J., Kouides, P., Ragni, M., Leebeek, F. W. G., ... Ewenstein, B. (2015). Hemostatic efficacy, safety, and pharmacokinetics of a recombinant von Willebrand factor in severe von Willebrand disease. *Blood*, 126(17), 2038–2046.
- Gilman, A. L., Beams, F., Tefft, M., & Mazumder, A. (1996). The effect of hydroxychloroquine on alloreactivity and its potential use for graft-versus-host disease. *Bone marrow transplantation*, 17(6), 1069–1075.
- Giordano, N., Sancasciani, S., Cantore, M., Fioravanti, A., Gandolfo, G., Conti, L., & Marcolongo, R. (1987). Thrombocytopenic purpura associated with piroxicam. *Clinical and experimental rheumatology*, 5(3), 298–300.
- Glynne, P., Salama, A., Chaudhry, A., Swirsky, D., & Lightstone, L. (1999). Quinine-induced immune thrombocytopenic purpura followed by hemolytic uremic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 33(1), 133–137.
- Go, O., Naqvi, A., Tan, A., Amzuta, I., & Lenox, R. (2008). The spectrum of thrombotic thrombocytopenic purpura: a clinicopathologic demonstration of tacrolimus-induced thrombotic thrombocytopenic purpura in a lung transplant patient. *Southern medical journal*, 101(7), 744–747.
- Goldman, F. D., Gilman, A. L., Hollenback, C., Kato, R. M., Premack, B. A., & Rawlings, D. J. (2000). Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Blood*, 95(11), 3460–3466.
- Gonzalez-Vicent, M., Diaz, M. A., & Madero, L. (1999). An uncommon case of late thrombotic thrombocytopenic purpura (42 months) after autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in a child. *Bone Marrow Transplant*, 23(7), 735–736.
- Gottschall, J. L., Elliot, W., Lianos, E., McFarland, J. G., Wolfmeyer, K., & Aster, R. H. (1991). Quinine-induced immune thrombocytopenia associated with hemolytic uremic syndrome: a new clinical entity. *Blood*, 77(2), 306–310.
- Goudemand, J., Scharrer, I., Berntorp, E., Lee, C. A., Borel-Derlon, A., Stieltjes, N., ... Mannucci, P. M. (2005). Pharmacokinetic studies on Wilfactin®, a von Willebrand factor concentrate with a low factor VIII content treated with three virus-inactivation/removal methods. *JTH*, 3(10), 2219–2227.
- Graefe, K. H. (2016). Pharmakologie und Toxikologie. *Thieme Verlagsgruppe*, (2. Auflage), 208f.
- Guengerich, F. P. (1992). Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *The FASEB Journal*, 6(2), 745–748.
- Gupta, R., & Wargo, K. A. (2005, October). Rifampin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *The Annals of pharmacotherapy*, 39(10), 1761–1762.

- Gupta, S., Ttan, N., Topolsky, D., Sesok-Pizzini, D., Crilley, P., Balasubramanian, M., ... Styler, M. (2005, November). Thrombotic thrombocytopenic purpura induced by cyclosporin a after allogeneic bone marrow transplantation treated by red blood cell exchange transfusion: a case report. *Am J Hematol*, 80(3), 246-247.
- Gurevitz, S. A., & Zorinsky, D. (2011). A Rare Case of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Presenting With Pancreatitis. *Laboratory Medicine*, 42(6), 329-331.
- Ha-Duong, N. T., Dijols, S., Macherey, A. C., Goldstein, J. A., Dansette, P. M., & Mansuy, D. (2001). Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of human cytochrome P450 2C19. *Biochemistry*, 40(40), 12112-12122.
- Harrell, R. M., Sibley, R., & Vogelzang, N. J. (1982). Renal vascular lesions after chemotherapy with vinblastine, bleomycin, and cisplatin. *Am J Med*, 73(3), 354-356.
- Hashmi, H. R. T., Diaz-Fuentes, G., Jadhav, P., & Khaja, M. (2015). Ciprofloxacin-Induced Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Case of Successful Treatment and Review of the Literature. *Case reports in critical care*, 2015, Article ID 143832.
- Hawkins, B. M., Abu-Fadel, M., Vesely, S. K., & George, J. N. (2008). Clinical cardiac involvement in thrombotic thrombocytopenic purpura: A systematic review. *Transfusion*, 48(2), 382-392.
- Hellmann, M., Hallek, M., & Scharrer, I. (2010). Thrombotisch-thrombozytopenische purpura. *Internist*, 51(9), 1136-1144.
- Herbert, J. M., & Savi, P. (2003). P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Seminars in Vascular Medicine*, 3(2), 113-121.
- Herlitz, H., Petersson, A., Sigström, L., Wennmalm, A., & Westberg, G. (1997). The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 31(5), 477-9.
- Hill, J. B., & Cooper, W. M. (1968). Thrombotic thrombocytopenic purpura. Treatment with corticosteroids and splenectomy. *Arch Intern Med*, 122(4), 353-356.
- Hochdörfer, T., Tiedje, C., Stumpo, D. J., Blackshear, P. J., Gaestel, M., & Huber, M. (2013). LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in mast cells is dependent on p38 but independent of TTP. *Cellular Signalling*, 25(6), 1339-1347.
- Hochstetler, L. A., Flanigan, M. J., & Lager, D. J. (1994). Transplant-associated thrombotic microangiopathy: the role of IgG administration as initial therapy. *Am J Kidney Dis*, 23(3), 444-450.
- Hogan, K. A., Weiler, H., & Lord, S. T. (2002). Mouse models in coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 87(4), 563-574.
- Hoirisch-Clapauch, S., & Nardi, A. E. (2014). A role for tissue plasminogen activator in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Medical Hypotheses*, 83(6), 747-750.
- Holdrinet, R. S., de Pauw, B. E., & Haanen, C. (1983). Hormonal dependent thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Scandinavian journal of haematology*, 30(3), 250-256.
- Hong, M. J., Lee, H. G., Hur, M., Kim, S. Y., Cho, Y. H., & Yoon, S. Y. (2011). Slow, but complete, resolution of mitomycin-induced refractory thrombotic thrombocytopenic purpura after rituximab treatment. *The Korean journal of hematology*, 46(1), 45-48.

- Hosler, G., & Hutchins, G. (2003). Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome Are Distinct Pathologic Entities. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127, 834–839.
- Hrdinová, J., D'Angelo, S., Graça, N. A. G., Ercig, B., Vanhoorelbeke, K., Veyradier, A., ... Coppo, P. (2018). Dissecting the pathophysiology of immune thrombotic thrombocytopenic purpura: interplay between genes and environmental triggers. *Haematologica*, 103(7), 1099–1109.
- Huang, J., Roth, R., Heuser, J. E., & Sadler, J. E. (2009). Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress. *Vascular Biology*, 113(7), 1589–1598.
- Hughes, C., Mcewan, J. R., Longair, I., Hughes, S., Cohen, H., Machin, S., & Scully, M. (2009). Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: Association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS 13. *JTH*, 7(4), 529–536.
- Humphreys, B. D., Sharman, J. P., Henderson, J. M., Clark, J. W., Marks, P. W., Rennke, H. G., ... Magee, C. C. (2004). Gemcitabine-associated thrombotic microangiopathy. *Cancer*, 100(12), 2664–2670.
- Hunt, D., Kavanagh, D., Drummond, I., Weller, B., Bellamy, C., Overell, J., ... Chandran, S. (2014, March). Thrombotic microangiopathy associated with interferon beta. *N Engl J Med*, 370(13), 1270–1271.
- Husnain, M., Gondal, F., Raina, A. I., Riaz, I. Bin, & Anwer, F. (2016). Quetiapine Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Case Report and Literature Review. *American journal of therapeutics*, 24(5), e615–e616.
- Huynh, M., Chee, K., & Lau, D. H. M. (2005). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with quetiapine. *The Annals of pharmacotherapy*, 39(7–8), 1346–1348.
- Iams, W., Beckermann, K. E., Neff, A. T., Mayer, I. A., & Abramson, V. G. (2013). Thrombotic microangiopathy during docetaxel, trastuzumab, and carboplatin chemotherapy for early-stage HER2+ breast cancer: a case report. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 30(2), 568.
- Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C., ... Coughlin, S. R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 386(6624), 502–506.
- Ishikawa, T., Makita, M., Saeki, K., Hara, Y., Yamamoto, K., & Imajo, K. (2012). [Clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura]. *[Rinsho ketsueki] The Japanese journal of clinical hematology*, 53(6), 628–631.
- Izzedine, H., Isnard-Bagnis, C., Launay-Vacher, V., Mercadal, L., Tostivint, I., Rixe, O., ... Deray, G. (2006). Gemcitabine-induced thrombotic microangiopathy: A systematic review. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(11), 3038–3045.
- Jackson, C. W., Steward, S. A., Chenaille, P. J., Ashmun, R. A., & McDonald, T. P. (1990). An analysis of megakaryocytopoiesis in the C3H mouse: an animal model whose megakaryocytes have 32N as the modal DNA class. *Blood*, 76(4), 690–696.
- Jacob, S., Dunn, B. L., Qureshi, Z. P., Bandarenko, N., Kwaan, H. C., Pandey, D. K., ... Bennett, C. L. (2012). Ticlopidine-, clopidogrel-, and prasugrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: A 20-year review from the southern network on adverse reactions (SONAR). *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*.

- James, Paula D, and Anne C Goodeve (2011). "von Willebrand disease." *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* 13(5), 365-76.
- Java, A., Edwards, A., Rossi, A., Pandey, R., Gaut, J., Delos Santos, R., ... Brennan, D. (2015). Cytomegalovirus-induced thrombotic microangiopathy after renal transplant successfully treated with eculizumab: case report and review of the literature. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 28(9), 1121–1125.
- Jian, C., Xiao, J., Gong, L., Skipwith, C. G., Jin, S.-Y., Kwaan, H. C., & Zheng, X. L. (2012). Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 119(16), 3836–3843.
- John, M. L., Hitzler, W., & Scharrer, I. (2012). The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 91(4), 507–510.
- Kabanov, D. S., Serov, D. A., Zubova, S. V, Grachev, S. V, & Prokhorenko, I. R. (2016). Dynamics of Antagonistic Potency of Rhodobacter capsulatus PG Lipopolysaccharide against Endotoxin-Induced Effects. *Biochemistry*, 81(3), 275–283.
- Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J. P., & Meyer, D. (1987). Localization of a collagen-interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues Gly 911 and Glu 1,365. *Blood*, 70(5), 1577–83.
- Kallal, S. M., & Lee, M. (1996). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with histamine H2-receptor antagonist therapy. *The Western journal of medicine*, 164(5), 446–448.
- Kapila, A., Chhabra, L., Chaubey, V. K., & Summers, J. (2014). Opana ER abuse and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)-like illness: a rising risk factor in illicit drug users. *BMJ case reports*, 2014.
- Kapiteijn, E., Brand, A., Kroep, J., & Gelderblom, H. (2007, October). Sunitinib induced hypertension, thrombotic microangiopathy and reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *Ann Oncol*, 18(10), 1745-1747.
- Kappers-Klunne, M. C., Wijermans, P., Fijnheer, R., Croockewit, A. J., Van Der Holt, B., De Wolf, J. T. M., ... Brand, A. (2005). Splenectomy for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 130(5), 768–776.
- Karkowski, L., Wolf, M., Lescampf, J., Copperre, B., Veyradier, A., Ninet, J., & Hot, A. (2011). [Clopidogrel induced thrombotic thrombocytopenic purpura]. *La Revue de medecine interne*, 32(12), 762–765.
- Karti, S. S., Eren, N., Sönmez, M., Yilmaz, M., Çobanoğlu, Ü., Kavgaci, H., ... Ovali, E. (2003). Leiomyosarcoma of the uterus presenting with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Turkish Journal of Haematology*, 20(3), 163–165.
- Kasi, P. M. (2011). Thrombotic thrombocytopenic purpura and gemcitabine. *Case Reports in Oncology*, 4(1), 143–148.
- Kasper, S., Neurath, M. F., Huber, C., Theobald, M., & Scharrer, I. (2007). Protein A immunoadsorption therapy for refractory, mitomycin C-associated thrombotic microangiopathy. *Transfusion*, 47(7), 1263–1267.

- Keung, Y. K., Morgan, D., & Cobos, E. (1996, March). Cocaine-induced microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia simulating thrombotic thrombocytopenia purpura. *Ann Hematol*, 72(3), 155-156.
- Khanal, N., Dahal, S., Upadhyay, S., Bhatt, V. R., & Bierman, P. J. (2015). Differentiating malignant hypertension-induced thrombotic microangiopathy from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Therapeutic advances in hematology*, 6(3), 97-102.
- Khodor, S., Castro, M., McNamara, C., & Chaulagain, C. P. (2016). Clopidogrel-induced refractory thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with rituximab. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 9(2), 76-79.
- Kiki, I., Gundogdu, M., Albayrak, B., & Bilgic, Y. (2008). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Brucella infection. *The American journal of the medical sciences*, 335(3), 230-232.
- King, J., de la Cruz, J., & Lutzky, J. (2017). Ipilimumab-induced thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Journal for immunotherapy of cancer*, 5, 19.
- Kiss, J. E. (2010). Thrombotic thrombocytopenic purpura: Recognition and management. *International Journal of Hematology*, 91(1), 36-45.
- Kitano, K., Gibo, Y., Kamijo, A., Furuta, K., Oguchi, S., Joshita, S., ... Fujimura, Y. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pegylated-interferon alpha-2a by an ADAMTS13 inhibitor in a patient with chronic hepatitis C. *Haematologica*, 91(8 Suppl), ECR34.
- Klaus, C., Plaimauer, B., Studt, J. D., Dorner, F., Lämmle, B., Mannucci, P. M., & Scheiflinger, F. (2004). Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103(12), 4514-4519.
- Kojouri, K., Vesely, S. K., & George, J. N. (2001). Quinine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: frequency, clinical features, and long-term outcomes. *Ann Intern Med*, 135(12), 1047-1051.
- Kok, R. H. J., Wolfhagen, M. J. H. M., Mooi, B. M., & Offerman, J. J. G. (1999). A patient with thrombotic thrombocytopenic purpura caused by *Campylobacter jejuni* septicemia. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 5(5), 297-298.
- Kokame, K., Matsumoto, M., Soejima, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Funato, M., ... Fujimura, Y. (2002). Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18), 11902-11907.
- Komar-Stossel, C., Gross, E., Dery, E., Corchia, N., Meir, K., Fried, I., & Abramovitch, R. (2014). TL-118 and gemcitabine drug combination display therapeutic efficacy in a mycn amplified orthotopic neuroblastoma murine model - Evaluation by MRI. *PLoS ONE*, 9(3), 1-8.
- Kopić, A., Benamara, K., Piskernik, C., Plaimauer, B., Horling, F., Höbarth, G., ... Höllriegel, W. (2016). Preclinical assessment of a new recombinant ADAMTS-13 drug product (BAX930) for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *JTH*, 14(7), 1410-1419.
- Korff, S., Katus, H. A., & Giannitsis, E. (2006). Differential diagnosis of elevated troponins. *Heart*, 92(7), 987-993.

- Korthagen, N. M., Bastiaans, J., van Meurs, J. C., van Bilsen, K., van Hagen, P. M., & Dik, W. A. (2015). Chloroquine and Hydroxychloroquine Increase Retinal Pigment Epithelial Layer Permeability. *J Biochem Mol Toxicol*, 29(7), 299–304.
- Kotbi, N., Han, B., Cheng, D., & Odom, A. E. (2015). Opana(®) ER induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *International Medical Case Reports Journal*, 8, 97-98.
- Kremer Hovinga, J., & Lämmle, B. (2012). Role of ADAMTS13 in the pathogenesis , diagnosis , and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura, (Figure 1), 610–616.
- Kressel, B. R., Ryan, K. P., Duong, A. T., Berenberg, J., & Schein, P. S. (1981). Microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, and renal failure in patients treated for adenocarcinoma. *Cancer*, 48(8), 1738–1745.
- Kuperman, A. A., Baidousi, A., Nasser, M., Braester, A., & Nassar, F. (2010). Microangiopathic Anemia of Acute Brucellosis - is it a True TTP? *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 2(3), e2010031.
- Kurtaran, B., Oto, O. A., Candevir, A., Inal, A. S., & Sirin, Y. (2011). A case of HIV infection with thrombocytopenia: Assosiation of HIV, thrombotic thrombocytopenic purpura and brucellosis. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 27(1), 35–38.
- Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., & Jerala, R. (2011). Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4794–4804.
- Kwaan, H. C. (2005). Thrombotic thrombocytopenic purpura: a diagnostic and therapeutic challenge. *Semin Thromb Hemost*, 31(6), 615–624.
- Kyaw, C. A., Yu, P.-J., & Manetta, F. (2016). Elevated Factor VIII Levels Associated with Acute Graft Occlusion and Arterial and Venous Thrombosis After Off Pump CABG. *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc*, 25(5), 139–141.
- Lacotte, L., Thierry, A., Delwail, V., Dreyfus, B., & Guilhot, F. (2000). Thrombotic thrombocytopenic purpura during interferon alpha treatment for chronic myelogenous leukemia. *Acta haematologica*, 102(3), 160–162.
- Laffan, M. A., Lester, W., O'Donnell, J. S., Will, A., Tait, R. C., Goodeve, A., ... Keeling, D. M. (2014). The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*, 167(4), 453–465.
- Lambot, F., Hanson, B., & Sztern, B. (2010). [Thrombotic thrombocytopenic purpura mediated by an ADAMTS13-inhibitor related to a treatment with pegylated-interferon alpha-2a and ribavirine in a patient with chronic hepatitis C]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, 39(11), 1207–1210.
- Lancellotti, S., Basso, M., & De Cristofaro, R. (2013). Proteolytic processing of Von Willebrand Factor by Adamts13 and Leukocyte Proteases. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1), e2013058.
- Lankhof, H., Van Hoeij, M., Schiphorst, M. E., Bracke, M., Wu, Y. P., Ijsseldijk, M. J. W., ... Sixma, J. J. (1996). A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thrombosis and Haemostasis*, 75(6), 950–958.

- Lapointe, M., Baillie, G. M., Bhaskar, S. S., Richardson, M. S., Self, S. E., Baliga, P. K., & Rajagopalan, P. R. (1999). Cyclosporine-induced hemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis following renal transplantation. *Clinical transplantation*, 13(6), 526–530.
- Larochelle, C., Grand'maison, F., Bernier, G. P., Latour, M., Cailhier, J.-F., & Prat, A. (2014). Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome in relapsing-remitting multiple sclerosis patients on high-dose interferon beta. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 20(13), 1783–1787.
- Lau, W. C., Gurbel, P. A., Watkins, P. B., Neer, C. J., Hopp, A. S., Carville, D. G. M., ... Bates, E. R. (2004). Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*, 109(2), 166–171.
- Leach, J. W., Pham, T., Diamandidis, D., & George, J. N. (1999). Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome (TTP-HUS) following treatment with deoxycoformycin in a patient with cutaneous T-cell lymphoma (Sezary syndrome): A case report. *Am J Hematol*, 61(4), 268–270.
- Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tyden, H., Lood, C., Truedsson, L., ... Blom, A. M. (2012). Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol*, 188(7), 3522–3531.
- Lesesne, J. B., Rothschild, N., Erickson, B., Korec, S., Sisk, R., Keller, J., ... Neefe, J. R. (1989). Cancer-associated hemolytic-uremic syndrome: Analysis of 85 cases from a national registry. *Journal of Clinical Oncology*, 7(6), 781–789.
- Letchumanan, P., Ng, H.-J., Lee, L.-H., & Thumboo, J. (2009). A comparison of thrombotic thrombocytopenic purpura in an inception cohort of patients with and without systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 48(4), 399–403.
- Levi, M., Toh, C. H., Thachil, J., & Watson, H. G. (2009). Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol*, 145(1), 24–33.
- Levin, J., & Ebbe, S. (1994, June). Why are recently published platelet counts in normal mice so low? *Blood*, 83(12), 3829–3831.
- Levy, G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., ... Tsai, H. M. (2001). Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413(6855), 488–494.
- Levy, G., Motto, D., & Ginsburg, D. (2005). ADAMTS13 turns 3. *Blood*, 106(1), 11–17.
- Liatsos, G., Elefsiniotis, I., Todorova, R., & Moulakakis, A. (2006, March). Severe thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) induced or exacerbated by the immunostimulatory herb Echinacea. *Am J Hematol*, 81(3), 224.
- Liles, N. W., Page, E. E., Liles, A. L., Vesely, S. K., Raskob, G. E., & George, J. N. (2016). Diversity and severity of adverse reactions to quinine: A systematic review. *Am J Hematol*, 91(5), 461–466.
- Lindquist, J. R., & George, R. P. (1981, December). Thrombotic thrombocytopenic purpura: onset during dipyridamole therapy. *JAMA*, 246(22), 2577.
- Liu, M. Y., Zhou, Z., Ma, R., Tao, Z., Choi, H., Bergeron, A. L., ... Dong, J. F. (2012). Gender-dependent up-regulation of ADAMTS-13 in mice with obesity and

- hypercholesterolemia. *Thrombosis Research*, 129(4), 536–539.
- Lombard-Platlet, S., Bertolino, P., Deng, H., Gerlier, D., & Rabourdin-Combe, C. (1993). Inhibition by chloroquine of the class II major histocompatibility complex-restricted presentation of endogenous antigens varies according to the cellular origin of the antigen-presenting cells, the nature of the T-cell epitope, and the responding T cell. *Immunology*, 80(4), 566–573.
- Lopez Izquierdo, A., Calvo-Villas, J. M., Ramirez-Sanchez, M., & Sicilia Guillen, F. (1999, October). Oral contraceptives and thrombocytopenic thrombotic purpura. *Sangre*, 44(5), 388–389.
- Lotta, L. A., Degasperi, E., Aghemo, A., Ferrari, B., Peyvandi, F., & Colombo, M. (2013, February). Treatment of chronic hepatitis C with pegylated interferon-alpha in a patient with recurrent autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 23(1), 66–68.
- Lotta, L. A., Garagiola, I., Palla, R., Cairo, A., & Peyvandi, F. (2010). ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Human mutation*, 31(1), 11–19.
- Lu, Y., Yeh, W., & Ohashi, P. S. (2008). LPS / TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151.
- Ma, A., & Goetz, M. B. (2013). Capnocytophaga canimorsus sepsis with associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *The American journal of the medical sciences*, 345(1), 78–80.
- Mai Falk, J., & Scharrer, I. (2016). Idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: strongest risk factor for relapse from remission is having had a relapse. *Transfusion*, 56(11), 2819–2823.
- Mak, S. K., Lo, K. Y., Lo, M. W., Chan, S. F., Lo, K. C., Wong, Y. Y., ... Wong, A. K. (2009). Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and membranoproliferative glomerulonephritis successfully treated with rituximab: a case associated with hepatitis C virus infection. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi*, 15(3), 201–208.
- Mancano, M. A. (2014, March). Connective Tissue Disease Following Hepatitis B Vaccination; Topiramate-Associated Fatal Heat Stroke; Ramelteon-Induced Autoimmune Hepatitis; Acute Oxaliplatin-Induced Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hospital Pharmacy*, 49(3), 227–231.
- Manco-Johnson, M. J., Abshire, T. C., Shapiro, A. D., Riske, B., Hacker, M. R., Kilcoyne, R., ... Evatt, B. L. (2007). Prophylaxis versus Episodic Treatment to Prevent Joint Disease in Boys with Severe Hemophilia. *N Engl J Med*, 357(6), 535–544.
- Manea, M., Kristoffersson, A., Schneppenheim, R., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Mörgelin, M., ... Karpman, D. (2007). Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 138(5), 651–662.
- Mannucci, P. M., Canciani, M. T., Forza, I., Lussana, F., Lattuada, A., & Rossi, E. (2001). Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 98(9), 2730–2735.
- Mannucci, P. M., Capoferri, C., & Canciani, M. T. (2004). Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br J Haematol*, 126(2), 213–

- Mansouri Taleghani, M., von Krogh, A. S., Fujimura, Y., George, J. N., Hrachovinova, I., Knöbl, P. N., ... Kremer Hovinga, J. A. (2013). Hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura and the hereditary TTP registry. *Hamostaseologie*, 33(2), 138–143.
- Mar, N., & Mendoza Ladd, A. (2011). Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: puzzles, curiosities and conundrums. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 31(1), 119–121.
- Maramattom, B. V., Patil, R., Thomas, P., & Upendran, B. (2015). Tacrolimus associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and stroke in the young. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 18(1), 126–127.
- Marder, E., Kirschke, D., Robbins, D., Dunn, J., Jones, T., & Racoon, J. (2013). Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)-like illness associated with intravenous Opana ER abuse--Tennessee, 2012. *MMWR*, 62(1), 1–4.
- Mariotte, E., Azoulay, E., Galicier, L., Rondeau, E., Zouiti, F., Boisseau, P., ... French Reference Center for Thrombotic, M. (2016). Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol*, 3(5), e237-245.
- Marjolaine, M., Marc, B., Marc, B., Pascale, L., Sandrine, M., Kahina, A., ... Paul, C. (2014). 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*, 54(2), 389–397.
- Martin, C., Morales, L. D., & Cruz, M. A. (2007). Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Ib $\alpha$ , *JTH*, 5(7), 1363–1370.
- Martin, F. A., Murphy, R. P., & Cummins, P. M. (2013). Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 304(12), H1585–H1597.
- Martin, M. G., Whitlatch, N. L., Shah, B., & Arepally, G. M. (2007). Thrombotic thrombocytopenic purpura induced by trimethoprim-sulfamethoxazole in a Jehovah's Witness. *Am J Hematol*, 82(7), 679–681.
- Maruoka, H., Koga, T., Inoue, Y., Honda, S., Takeo, M., Fukuda, T., & Aizawa, H. (2007). Recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with systemic lupus erythematosus. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 17(5), 426–8.
- Matsuda, N., Yoshihara, A., Nishikata, R., Matsuda, T., Endo, K., & Yamamoto, T. (2006). [A case of ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: special emphasis on diffusion weighted MRI]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*, 46(10), 693–698.
- Mattson, D. L. (2001). Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am J Hypertens*, 14(5 Pt 1), 405–408.
- Mauro, M., Zlatopolskiy, A., Raife, T. J., & Laurence, J. (2004). Thienopyridine-linked thrombotic microangiopathy: association with endothelial cell apoptosis and activation of MAP kinase signalling cascades. *Br J Haematol*, 124(2), 200–210.

- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual review of pathology*, 9, 181–218.
- Mazurier, C., Poulle, M., Samor, B., Hilbert, L., & Chtourou, S. (2004). In vitro study of a triple-secured von Willebrand factor concentrate. *Vox sanguinis*, 86(2), 100–104.
- Mazurkiewicz-Pisarek, A., Plucienniczak, G., Ciach, T., & Plucienniczak, A. (2016). The factor VIII protein and its function. *Acta biochimica Polonica*, 63(1), 11–16.
- Mazzucato, M., Spessotto, P., Masotti, A., De Appollonia, L., Cozzi, M. R., Yoshioka, A., ... De Marco, L. (1999). Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *JBC*, 274(5), 3033–3041.
- Mccarthy, L. J., Danielson, C. F. M., Skipworth, E. M., Peters, S. L., Miraglia, C. C., & Antony, A. C. (2002). Myocardial Infarction / Injury Is Relatively Common at Presentation of Acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura : The Indiana University Experience, 6(April 2001), 2–4.
- McDonald, V., Laffan, M., Benjamin, S., Bevan, D., Machin, S., & Scully, M. A. (2009). Thrombotic thrombocytopenic purpura precipitated by acute pancreatitis: a report of seven cases from a regional UK TTP registry. *Br J Haematol*, 144(3), 430–433.
- McGrath, R. T., van den Biggelaar, M., Byrne, B., O’Sullivan, J. M., Rawley, O., O’Kennedy, R., ... O’Donnell, J. S. (2013). Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood*, 122(25), 4107–4110.
- McShane, P. M., Bern, M. M., & Schiff, I. (1983). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with oral contraceptives: a case report. *American journal of obstetrics and gynecology*, 145(6), 762–763.
- Medina, P. J., Sipols, J. M., & George, J. N. (2001). Drug-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Current opinion in hematology*, 8(5), 286–293.
- Meyer, S. F. De, Deckmyn, H., & Vanhoorelbeke, K. (2009). von Willebrand factor to the rescue. *Current*, 113(21), 5049–5057.
- Meyer, S. F. De, Savchenko, A. S., Haas, M. S., Schatzberg, D., Carroll, M. C., Schiviz, A., ... Wagner, D. D. (2012). Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia /reperfusion injury in mice. *Blood*, 120(26), 1–4.
- Michaux, C., Randrianasolo, D., Vandenhende, M.-A., Hessamfar, M., Morlat, P., & Bonnet, F. (2013). [Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with interferon therapy in a HIV and HCV co-infected woman]. *La Revue de medecine interne*, 34(12), 773–775.
- Mikes, B., Sinkovits, G., Farkas, P., Csuka, D., Schlammadinger, Á., Rázsó, K., ... Prohászka, Z. (2014). Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis Research*, 133(4), 616–621.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*, 17(SUPPL. 5), 7–12.
- Mitsuiki, N., Tamanuki, K., Sei, K., Ito, J., Kishi, A., Kobayashi, K., ... Nagasawa, M. (2017). Severe neonatal CMV infection complicated with thrombotic microangiopathy successfully treated with ganciclovir. *Journal of infection and chemotherapy : official*

- 
- journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 23(2), 107–110.
- Moake, J. L., & Byrnes, J. J. (1996). Thrombotic microangiopathies associated with drugs and bone marrow transplantation. *Hematology/oncology clinics of North America*, 10(2), 485–497.
- Moake, J. L., Rudy, C. K., Troll, J. H., Weinstein, M. J., Colannino, N. M., Azocar, J., ... Deykin, D. (1982). Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 307(23), 1432–1435.
- Mohlke, K. L., Nichols, W. C., Westrick, R. J., Novak, E. K., Cooney, K. A., Swank, R. T., & Ginsburg, D. (1996). A novel modifier gene for plasma von Willebrand factor level maps to distal mouse chromosome 11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15352–15357.
- Mohri, H., Yoshioka, A., Zimmerman, T. S., & Ruggeri, Z. M. (1989). Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin, and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *JBC*, 264(29), 17361–17367.
- Montes, A., Powles, T. J., O'Brien, M. E., Ashley, S. E., Luckit, J., & Treleaven, J. (1993). A toxic interaction between mitomycin C and tamoxifen causing the haemolytic uraemic syndrome. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(13), 1854–1857.
- Morales, L. D., Martin, C., & Cruz, M. A. (2006). The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: Mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *JTH*, 4(2), 417–425.
- Morrin, M. J., Jones, F. G. C., McConville, J., Arnold, C., Mullan, B., Lavery, G. G., & McMullin, M. F. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to *Streptococcus*. *Transfusion and apheresis science*, 34(2), 153–155.
- Moschcowitz, E. (1952). An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease. *Am J Med*, 13(5), 567–569.
- Mouraux, A., Gille, M., Pieret, F., & Declercq, I. (2002). [Fulminant thrombotic thrombocytopenic purpura in the course of ciprofloxacin therapy]. *Revue neurologique*, 158(11), 1115–1117.
- Muia, J., Zhu, J., Gupta, G., Haberichter, S. L., Friedman, K. D., Feys, H. B., ... Sadler, J. E. (2014). Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), 18584–18589.
- Mulder, A. H., Gerlag, P. G., Verhoef, L. H., & van den Wall Bake, A. W. (2001). Hemolytic uremic syndrome after capnocytophaga canimorsus (DF-2) septicemia. *Clinical nephrology*, 55(2), 167–170.
- Müller-Calleja, N., Manukyan, D., Canisius, A., Strand, D., & Lackner, K. J. (2016). Hydroxychloroquine inhibits proinflammatory signalling pathways by targeting endosomal NADPH oxidase. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76, 891–897.
- Murphy, A. M. (2002, September). Troponin I: in sickness and in health-and normal development. *Circulation research*, 91(6), 449–450.
- Musio, F., Bohen, E. M., Yuan, C. M., & Welch, P. G. (1998). Review of thrombotic thrombocytopenic purpura in the setting of systemic lupus erythematosus. *Seminars in*

- arthritis and rheumatism*, 28(1), 1–19.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Menzel, S., & Ruth, P. (2012). Mutschler Arzneimittelwirkungen, 10. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart.
- Myers, K. A., & Marrie, T. J. (1993). Thrombotic microangiopathy associated with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia: case report and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 17(6), 1037–1040.
- Nakamura, K., Inokuchi, R., Hiruma, T., Ohshima, K., Sonoo, T., Tokunaga, K., ... Nakajima, S. (2016). Recombinant thrombomodulin for secondary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Medicine (United States)*, 95(24).
- Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J., & Coughlin, S. R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 404(6778), 609–613.
- Naseer, N., Aijaz, A., Saleem, M. A., Nelson, J., Peterson, S. J., & Frishman, W. H. (2001). Ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Heart disease (Hagerstown, Md.)*, 3(4), 221–223.
- Nazzal, M., Safi, F., Arma, F., Nazzal, M., Muzaffar, M., & Assaly, R. (2011). Micafungin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature. *American journal of therapeutics*, 18(6), e258-60.
- Neblock, D. S., & Berg, R. A. (1982). Lysosomotropic agents ammonium chloride and chloroquine inhibit both the synthesis and secretion of procollagen by freshly isolated embryonic chick tendon cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 105(3), 902–908.
- Nemmar, A., Al-Salam, S., Yuvaraju, P., Beegam, S., Yasin, J., & Ali, B. H. (2017). Chronic exposure to water-pipe smoke induces cardiovascular dysfunction in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 312(2), H329–H339.
- Nguyen, T. C., Liu, A., Liu, L., Ball, C., Choi, H., May, W. S., ... Dong, J. F. (2007). Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica*, 92(1), 121–124.
- Nishijima, Y., Hirata, H., Himeno, A., Kida, H., Matsumoto, M., Takahashi, R., ... Kumanogoh, A. (2013). Drug-induced thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with recombinant human soluble thrombomodulin. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 52(10), 1111–1114.
- Noris, M., & Remuzzi, G. (2010). Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 10(7), 1517–1523.
- Noris, M., & Remuzzi, G. (2013, November). Overview of Complement Activation and Regulation. *Seminars in Nephrology*, 33(6), 479–492.
- Nuytens, B. P., Thijs, T., Deckmyn, H., & Broos, K. (2011). Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis Research*, 127(SUPPL. 2), S26–S29.
- Odronic, S., Quraishy, N., Manroa, P., Kier, Y., Koo, A., Figueroa, P., & Hamilton, A. (2014). Cocaine-induced microangiopathic hemolytic anemia mimicking idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature. *Journal of clinical apheresis*, 29(5), 284–289.

- Onitilo, A. A., Engel, J. M., Clouse, L. H., & Gerndt, K. M. (2017). Successful Treatment of Mitomycin-induced Thrombotic Thrombocytopenic Purpura with Rituximab. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 20(2), 275–276.
- Oregel, K. Z., Ramdial, J., & Gluck, S. (2013). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 6, 19–22.
- Page, E. E., Little, D. J., Vesely, S. K., & George, J. N. (2018). Quinine-Induced Thrombotic Microangiopathy: A Report of 19 Patients. *Am J Kidney Dis*, 70(5), 686–695.
- Page, Y., Tardy, B., Zeni, F., Comtet, C., Terrana, R., & Bertrand, J. C. (1991). Thrombotic thrombocytopenic purpura related to ticlopidine. *Lancet*, 337(8744), 774–776.
- Patel, R., & Amber, K. T. (2016). Thrombotic thrombocytopenic purpura in a postoperative patient taking cephalexin responding to plasmapheresis: A case report and review of cephalosporin-induced TTP. *Journal of clinical apheresis*, 31(5), 473–475.
- Patole, S., & Ramya, I. (2015). Bilateral Renal Vein Thrombosis due to Elevated Factor VIII Levels. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 63(8), 87–88.
- Patschan, D., Witzke, O., Dührsen, U., Erbel, R., Philipp, T., & Herget-Rosenthal, S. (2006). Acute myocardial infarction in thrombotic microangiopathies--clinical characteristics, risk factors and outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(6), 1549–1554.
- Paz, M. M., Zhang, X., Lu, J., & Holmgren, A. (2012). A new mechanism of action for the anticancer drug Mitomycin C: Mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1502–1511.
- Peng, Q., Li, K., Sacks, S. H., & Zhou, W. (2009). The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflammation & allergy drug targets*, 8(3), 236–246.
- Pettitt, A. R., & Clark, R. E. (1994). Thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 14(4), 495–504.
- Peyvandi, F., Ferrari, S., Lavoretano, S., Canciani, M. T., & Mannucci, P. M. (2004). Von Willebrand factor cleaving (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 127(4), 433–439.
- Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J. A., Cataland, S., Knobl, P., Wu, H., ... Tersago, D. (2016). Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 374(6), 511–522.
- Phillips, E. H., Westwood, J. P., Brocklebank, V., Wong, E. K. S., Tellez, J. O., Marchbank, K. J., ... Scully, M. A. (2016). The role of ADAMTS-13 activity and complement mutational analysis in differentiating acute thrombotic microangiopathies. *JTH*, 14(1), 175–185.
- Piovela, F., Ricetti, M. M., Almasio, P., Samaden, A., Semino, G., & Ascari, E. (1984). The effect of ticlopidine on human endothelial cells in culture. *Thrombosis research*, 33(3), 323–332.
- Pisoni, R., Ruggerenti, P., & Remuzzi, G. (2001). Drug-induced thrombotic

- microangiopathy: incidence, prevention and management. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*, 24(7), 491–501.
- Plaimauer, B., Schiviz, A., Kaufmann, S., Hollriegl, W., Rottensteiner, H., & Scheifflinger, F. (2015). Neutralization of inhibitory antibodies and restoration of therapeutic ADAMTS-13 activity levels in inhibitor-treated rats by the use of defined doses of recombinant ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 13(11), 2053–2062.
- Poddar, N., & Wang, J. C. (2013, January). Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in a Patient with Interferon Treated Hepatitis C Successfully Treated with Rituximab. *Hematology Reports*, 5(1), 5-7.
- Ponticelli, C., & Banfi, G. (2006). Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation. *Transplant International*, 19(10), 789-794.
- Pratt, G., Kennedy, B., & Smith, G. (1999, July). Cyclosporin neurotoxicity after chemotherapy. The Case had features of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome. *BMJ (Clinical research ed.)*, 319(7201),54.
- Puyade, M., Badin, J., Quéron, B., Christiaens, L., Varroud-Vial, N., Pierre, F., & Pourrat, O. (2014). Purpura thrombotique thrombocytopenique : ne pas méconnaître l'atteinte cardiaque. *La Revue de Médecine Interne*, 35(4), 264–267.
- Quilichini, R., Zanolucca, S., Baume, D., Pichot de Champfleury, M., Sansot, D., & Delbeke, E. (1998, June). [Beware of the dog! A syndrome resembling thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Capnocytophaga canimorsus septicemia]. *La Revue de medecine interne*, 19(6),451-452.
- Quinn, M. J., & Fitzgerald, D. J. (1999). Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*, 100(15), 1667–1672.
- Raife, T. J., Cao, W., Atkinson, B. S., Bedell, B., Montgomery, R. R., Lentz, S. R., ... Zheng, X. L. (2009). Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood*, 114(8), 1666–1674.
- Rakhmanina, N., Wong, E. C. C., Davis, J. C., & Ray, P. E. (2014). Hemorrhagic Stroke in an Adolescent Female with HIV-Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Journal of AIDS & clinical research*, 5(6),311.
- Ramasubbu, K., Mullick, T., Koo, a, Hussein, M., Henderson, J. M., Mullen, K. D., & Avery, R. K. (2003). Thrombotic microangiopathy and cytomegalovirus in liver transplant recipients: a case-based review. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 5(2), 98–103.
- Rao Koduri, P. (2017). Simvastatin and thrombotic thrombocytopenic purpura. *The Lancet*, 352(9145), 2020.
- Rastegarlar, G., Pegon, J. N., Casari, C., Odouard, S., Navarrete, A. M., Saint-Lu, N., ... Lenting, P. J. (2012). Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood*, 119(9), 2126–2134.
- Rayes, J., Roumenina, L. T., Dimitrov, J. D., Repessé, Y., Ing, M., Christophe, O., ... Lacroix-Desmazes, S. (2014). The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood*, 123(1), 121–125.
- Reese, J. A., Bougie, D. W., Curtis, B. R., Terrell, D. R., Vesely, S. K., Aster, R. H., &

- George, J. N. (2015). Drug-induced thrombotic microangiopathy: Experience of the Oklahoma registry and the BloodCenter of Wisconsin. *Am J Hematol*, 90(5), 406–410.
- Regragui, S., Amelal, S., Astat, S., Zine, M., Alami Drideb, N., Al Bouzidi, A., ... Mikdame, M. (2012). Thrombotic Microangiopathy with Skin Localization Secondary to Cytarabine-Daunorubicin Association: Report of a Case. *Case Reports in Hematology*, 2012, Article ID 806476.
- Reiter, R. A., Varadi, K., Turecek, P. L., Jilma, B., & Knobl, P. (2005). Changes in ADAMTS13 (von-Willebrand-factor-cleaving protease) activity after induced release of von Willebrand factor during acute systemic inflammation. *Thromb Haemost*, 93(3), 554–558.
- Reti, M., Farkas, P., Csuka, D., Razso, K., Schlammadinger, A., Udvardy, M. L., ... Prohaszka, Z. (2012). Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10(5), 791–798.
- Richmond, J., Gilbar, P., & Abro, E. (2013). Gemcitabine-induced thrombotic microangiopathy. *Internal Medicine Journal*, 43(11), 1240–1242.
- Ridolfi, R. L., & Bell, W. R. (1981). Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 60(6), 413–428.
- Rinott, N., Mashiach, T., Horowitz, N. A., Schliamser, L., Sarig, G., Keren-Politansky, A., & Dann, E. J. (2015). A 14-Year Experience in the Management of Patients with Acquired Immune Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Northern Israel. *Acta Haematologica*, 134, 170–176.
- Riveiro-Barciela, M.; Bes, M.; Quer, J.; Valcarcel, D.; Piriz, S.; Gregori, J.; Llorens, M.; Salcedo, M.T.; Piron, M.; Esteban, R.; et al. (2018) Thrombotic thrombocytopenic purpura relapse induced by acute hepatitis E transmitted by cryosupernatant plasma and successfully controlled with ribavirin. *Transfusion*, 58 (11), 2501–2505.
- Rivkin, A. (2007). Thrombotic thrombocytopenic purpura induced by metronidazole vaginal gel. *Pharmacotherapy*, 27(7), 1058–1061.
- Rodriguez-Bano, J., Muniain, M. A., Gutierrez, M. D., & Perez Alonso, J. L. (1997). Splenectomy as the treatment in a case of recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with HIV infection. *Med Clin (Barc)*, 109(4), 156.
- Routy, J. P., Beaulieu, R., Monte, M., Saint Louis, J., Sauvageau, G., & Toma, E. (1991). Immunologic thrombocytopenia followed by thrombotic thrombocytopenic purpura in two HIV1 patients. *Am J Hematol*, 38(4), 327–328.
- Roy, V., Rizvi, M. A., Vesely, S. K., & George, J. N. (2001). Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndromes following bone marrow transplantation: an analysis of associated conditions and clinical outcomes. *Bone marrow transplantation*, 27(6), 641–646.
- Ruggeri, Z. (1997). Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology : von Willebrand Factor. *J. Clin. Invest.*, Volume 99(Number 4), 559–564.
- Thampi, S., Salmi, D., Imashuku, S., Ducore, J., Satake, N. (2011). Thrombotic thrombocytopenic purpura in a child with systemic lupus erythematosus. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 33(3), 221–223.
- Sadler, J.E., Lillicrap D.,(2013). Von Willebrand Disease: Diagnosis, Classification and

- Treatment. *Hemostasis and Thrombosis*, LWW, 6. Auflage, Chapter 52, 681.
- Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and Genetics of Von Willebrand Factor. *Annu. Rev. Biochemistry*, 67, 395–424.
- Sadler, J. E. (2006). Thrombotic thrombocytopenic purpura: a moving target. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 415–420.
- Saif, M. W., & McGee, P. J. (2005). Hemolytic-uremic syndrome associated with gemcitabine: a case report and review of literature. *JOP : Journal of the pancreas*, 6(4), 369–374.
- Sakai, C., Takagi, T., Wakatsuki, S., & Matsuzaki, O. (1995). Hemolytic-uremic syndrome due to deoxycorymycin: a report of the second case. *Intern Med*, 34(6), 593–596.
- Sambrano, G. R., Weiss, E. J., Zheng, Y. W., Huang, W., & Coughlin, S. R. (2001). Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, 413(6851), 74–78.
- Samimi, M. A., Mirkheshti, N., Heidarpour, M., & Abdollahi, M. (2010). Idiopathic thrombocytopenic purpura in women with breast cancer. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 15(6), 359–363.
- Sarode, R., Bandarenko, N., Brecher, M. E., Kiss, J. E., Marques, M. B., Szczepiorkowski, Z. M., & Winters, J. L. (2014). Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research. *J Clin Apher*, 29(3), 148–167.
- Sato, S., Inui, N., Ikeda, Y., & Hiraga, Y. (1989). A comparison of intraperitoneal injection and oral gavage in the micronucleus test with mitomycin C in mice. *Mutation research*, 223(4), 387–390.
- Scarlett, J. D., Williamson, H. G., Dadson, P. J., Fassett, R., & Peel, M. M. (1991, January). A syndrome resembling thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Capnocytophaga canimorsus septicemia. *Am J Med*, 90(1), 127–128.
- Schattner M. (2018). Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 105(5):873–880
- Scheiflinger, F., Knöbl, P., Trattner, B., Plaimauer, B., Mohr, G., Dockal, M., ... Rieger, M. (2003). Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 102(9), 3241–3243.
- Schiviz, A., Wuersch, K., Piskernik, C., Dietrich, B., Hoellriegel, W., Rottensteiner, H., ... Muchitsch, E. M. (2012). A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: Correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood*, 119(25), 6128–6135.
- Schmitt, A., Guichard, J., Massé, J. M., Debili, N., & Cramer, E. M. (2001). Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Experimental Hematology*, 29(11), 1295–1302.
- Schneider, P. A., Rayner, A. A., Linker, C. A., Schuman, M. A., Liu, E. T., & Hohn, D. C. (1985). The role of splenectomy in multimodality treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Surg*, 202(3), 318–322.

- Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, a, Gorzelanny, C., Alexander-Katz, a, Netz, R. R., & Schneider, M. F. (2007). Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 7899–7903.
- Schneppenheim, R., Kremer Hovinga, J. A., Becker, T., Budde, U., Karpman, D., Brockhaus, W., ... Lammle, B. (2006). A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thrombosis and haemostasis*, 96(1), 3–6.
- Schriber, J. R., Freedman, J. J., & Brandwein, J. M. (1993). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pneumococcal sepsis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 4(3), 145–147.
- Schroder, S., Spyridopoulos, I., Konig, J., Jaschonek, K. G., Luft, D., & Seif, F. J. (1995, September). Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) associated with a *Borrelia burgdorferi* infection. *Am J Hematol*, 50(1), 72–73.
- Schultz, D. R., Arnold, P. I., Jy, W., Valant, P. A., Gruber, J., Ahn, Y. S., ... Horstman, L. L. (1998). Anti-CD36 autoantibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic disorders: Identification of an 85 kD form of CD36 as a target antigen. *Br J Haematol*, 103(3), 849–857.
- Scully, M. (2012). Rituximab in the treatment of TTP. *Hematology*, 17 Suppl 1, S22–4.
- Scully, M., Cataland, S., Coppo, P., Rubia, J. D. E. L. A., & Friedman, K. D. (2016). Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost*, (May), 312–322.
- Scully, M., Hunt, B. J., Benjamin, S., Liesner, R., Rose, P., Peyvandi, F., ... Machin, S. J. (2012). Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*, 158(3), 323–335.
- Scully, M., Knöbl, P., Kentouche, K., Rice, L., Windyga, J., Schneppenheim, R., ... Ewenstein, B. (2017). Recombinant ADAMTS-13: First-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 130(19), 2055–2063.
- Scully, M., Yarranton, H., Liesner, R., Cavenagh, J., Hunt, B., Benjamin, S., ... Machin, S. (2008). Regional UK TTP Registry: Correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol*, 142(5), 819–826.
- Seki, Y., Toba, K., Fuse, I., Sato, N., Niwano, H., Takahashi, H., ... Aizawa, Y. (2005). In vitro effect of cyclosporin A, mitomycin C and prednisolone on cell kinetics in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thrombosis Research*, 115(3), 219–228.
- Selvi Sabater, P., Espuny Miro, A., Rizo Cerda, A. M., & de la Rubia Orti, J. E. (2016, March). [Cyclosporin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of three cases]. *Medicina clinica*, 146(5), 231–232.
- Semeraro, F., Ammollo, C. T., Morrissey, J. H., Dale, G. L., Friese, P., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: Involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*, 118(7), 1952–1961.
- Shah, G., Yamin, H., & Smith, H. (2013). Mitomycin-C-Induced TTP/HUS Treated Successfully with Rituximab: Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Hematol*, 2013, Article ID 130978.

- Shah, N., Rutherford, C., Matevosyan, K., Shen, Y. M., & Sarode, R. (2013). Role of ADAMTS13 in the management of thrombotic microangiopathies including thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Br J Haematol*, 163(4), 514–519.
- Shahsavarzadeh, T., Javanmard, S. H., & Saadatnia, M. (2011). Impact of Factor VIII and von Willebrand Factor Plasma Levels on Cerebral Venous and Sinus Thrombosis: Are They Independent Risk Factors? *European Neurology*, 66(4), 243–246.
- Sheldon, R., & Slaughter, D. (1986). A syndrome of microangiopathic hemolytic anemia, renal impairment, and pulmonary edema in chemotherapy-treated patients with adenocarcinoma. *Cancer*, 58(7), 1428–1436.
- Shenkman, B., & Einav, Y. (2014). Thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathic hemolytic anemias: Diagnosis and classification. *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), 584–586.
- Shivdasani, R. A., Rosenblatt, M. F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C. W., Hunt, P., Saris, C. J., & Orkin, S. H. (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 81(5), 695–704.
- Siersema, P. D., Kros, J. M., & van den Berg, B. (1989). Cardiac manifestations of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Netherlands Journal of Medicine*, 35(2), 100–107.
- Silva, V. A., Frei-Lahr, D., Brown, R. A., & Herzig, G. P. (1991). Plasma exchange and vincristine in the treatment of hemolytic uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura associated with bone marrow transplantation. *Journal of clinical apheresis*, 6(1), 16–20.
- Snyder, H. W., Mittelman, A., Oral, A., Messerschmidt, G. L., Henry, D. H., Korec, S., ... Wuest, D. (1993). Treatment of cancer chemotherapy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome by protein A immunoadsorption of plasma. *Cancer*, 71(5), 1882–1892.
- Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., & Nozaki, C. (2001). A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *Journal of biochemistry*, 130(4), 475–480.
- Starck, M., Abedinpour, F., Dendorfer, U., Wagner-Czekalla, J., Pachmann, M., Mann, J. F., & Nerl, C. (2005). Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura as the presenting symptom of systemic lupus erythematosus. Successful treatment with plasma exchange and immunosuppression--report of two cases. *Eur J Haematol*, 75(5), 436–440.
- Stitham, J., Midgett, C., Martin, K. A., & Hwa, J. (2011). Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Frontiers in pharmacology*, 2, 24.
- Stylianou, K., Tsirakis, G., Mantadakis, E., Xylouri, I., Foudoulakis, A., Vardaki, E., ... Samonis, G. (2009). Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with oral contraceptives and factor V Leiden: a case report. *Cases Journal*, 2, 6611.
- Şükran, K., Tatar, B., Ersan, G., & Topaloğlu, S. (2013, December). A Leptospirosis Case Presenting with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Balkan medical journal*, 30(4), 436–438.
- Suresh Kumar, G., Lipman, R., Cummings, J., & Tomasz, M. (1997). Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase. Revised mechanism of the enzymatic reductive

- activation of mitomycin C. *Biochemistry*, 36(46), 14128–14136.
- Taleghani, M. M., Krogh, A. Von, Fujimura, Y., George, J. N., & Hrachovinova, I. (2013). Hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura and the hereditary TTP registry, 33(2), 138–143.
- Tauchi, R., Imagama, S., Ohgomori, T., Natori, T., Shinjo, R., Ishiguro, N., & Kadomatsu, K. (2012). ADAMTS-13 is produced by glial cells and upregulated after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 517(1), 1–6.
- Tersteeg, C., de Maat, S., De Meyer, S. F., Smeets, M. W., Barendrecht, A. D., Roest, M., ... Maas, C. (2014). Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. *Circulation*, 129(12), 1320–1331.
- Tezcan, H., Zimmer, W., Fenstermaker, R., Herzig, G. P., & Schriber, J. (1998). Severe cerebellar swelling and thrombotic thrombocytopenic purpura associated with FK506. *Bone Marrow Transplant.*, 21, 105–109.
- Thachil, J. (2007). Causes of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet Oncology*, 8(9), 757–758.
- Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)-like illness associated with intravenous Opana ER abuse--Tennessee, 2012. (2013). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 62(1), 1–4.
- Thygesen, K., Mair, J., Giannitsis, E., Mueller, C., Lindahl, B., Blankenberg, S., ... Jaffe, A. S. (2012). How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *European Heart Journal*, 33(18), 2252–2257.
- Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., ... Fujikawa, K. (1986). Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, 25, 3171–3184.
- Trice, J. M., Pinals, R. S., & Plitman, G. I. (1983). Thrombotic thrombocytopenic purpura during penicillamine therapy in rheumatoid arthritis. *Archives of internal medicine*, 143(7), 1487–1488.
- Tsai, H. M. (1996). Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87(10), 4235–4244.
- Tsai, M. H., Tsai, S. L., Chen, T. C., & Liaw, Y. F. (2000). Ticlopidine-induced cholestatic hepatitis with anti-nuclear antibody in serum. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 99(11), 866–869.
- Tuccori, M., Guidi, B., Carulli, G., Blandizzi, C., Del Tacca, M., & Di Paolo, M. (2008). Severe thrombocytopenia and haemolytic anaemia associated with ciprofloxacin: a case report with fatal outcome. *Platelets*, 19(5), 384–387.
- Turecek, P. L., Mitterer, A., Matthiessen, H. P., Gritsch, H., Varadi, K., & Siekmann, J. (2009). Development of a plasma- and albumin -free recombinant von Willebrand factor, *Hämostaseologie*, 29(Suppl 1), 32–38.
- Turken, O., Ozturk, A., Orhan, B., Kandemir, G., & Yaylaci, M. (2003). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. *Acta haematologica*, 109(1), 40–42.
- Turner, J. L., Reardon, J., Bekaii-Saab, T., Cataland, S. R., & Arango, M. J. (2016).

- Gemcitabine-Associated Thrombotic Microangiopathy: Response to Complement Inhibition and Reinitiation of Gemcitabine. *Clinical colorectal cancer*, 16(2), e119-122.
- Turner, N., Sartain, S., & Moake, J. (2015). Ultralarge von Willebrand factor-induced platelet clumping and activation of the alternative complement pathway in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*, 29(3), 509–524.
- Ulrichs, H., Udvardy, M., Lenting, P. J., Pareyn, I., Vandeputte, N., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2006). Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V. *JBC*, 281(8), 4699–4707.
- Ulrichs, H., Vanhoorelbeke, K., Girma, J. P., Lenting, P. J., Vauterin, S., & Deckmyn, H. (2005). The von Willebrand factor self-association is modulated by a multiple domain interaction. *JTH*, 3(3), 552–561.
- Umemura, A., Sasaki, A., Nitta, H., Obuchi, T., Baba, S., & Wakabayashi, G. (2013). Laparoscopic splenectomy for the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin J Gastroenterol*, 6(6), 420–423.
- Upshaw, J. D. J. (1978). Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 298(24), 1350–1352.
- Valavaara, R., & Nordman, E. (1985). Renal complications of mitomycin C therapy with special reference to the total dose. *Cancer*, 55(1), 47–50.
- Van Eyk, J. E., Thomas, L. T., Tripet, B., Wiesner, R. J., Pearlstone, J. R., Farah, C. S., ... Hodges, R. S. (1997). Distinct regions of troponin I regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent activation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the acto-S1-TM ATPase activity of the thin filament. *JBC*, 272(16), 10529–10537.
- Veltman, G. A., Brand, A., Leeksa, O. C., ten Bosch, G. J., van Krieken, J. H., & Briet, E. (1995). The role of splenectomy in the treatment of relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 70(5), 231–236.
- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3), 178–189.
- Venugopal, A. (2014). Disseminated intravascular coagulation. *Indian journal of anaesthesia*, 58(5), 603–608.
- Verweij, J., & Pinedo, H. M. (1990). Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anti-cancer drugs*, 1(1), 5–13.
- Vesely, S. K., George, J. N., La, B., Studt, J., Alberio, L., El-harake, M. A., & Raskob, G. E. (2003). ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura – hemolytic uremic syndrome : relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients, 102(1), 60–68.
- Vieira-Martins, P., El Sissy, C., Bordereau, P., Gruber, A., Rosain, J., & Fremeaux-Bacchi, V. (2016). Defining the genetics of thrombotic microangiopathies. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 54(2), 212–219.
- Vipan, W. H. (1865). Quinine as a cause of purpura. *The Lancet*, July, 37.
- Volcy, J., Nzerue, C. M., Oderinde, A., & Hewan-Iowe, K. (2000). Cocaine-induced acute

- renal failure, hemolysis, and thrombocytopenia mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Kidney Dis*, 35(1), E3.
- von Auer, C., Wilken, A., & Scharrer, I. (2008). Mögliche Triggerfaktoren einer akuten TTP. *Haemostaseologie*, 4a(28 (Suppl 1)), 37.
- Wada, H., Kaneko, T., Ohiwa, M., Tanigawa, M., Tamaki, S., Minami, N., ... Shirakawa, S. (1992). Plasma cytokine levels in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 40(3), 167–170.
- Wahla, A. S., Ruiz, J., Nouredine, N., Upadhy, B., Sane, D. C., & Owen, J. (2008). Myocardial infarction in thrombotic thrombocytopenic purpura: a single-center experience and literature review. *European journal of haematology*, 81(4), 311–316.
- Walker, R. W., Rosenblum, M. K., Kempin, S. J., & Christian, M. C. (1989). Carboplatin-associated thrombotic microangiopathic hemolytic anemia. *Cancer*, 64(5), 1017–1020.
- Walpole, S. C., Prieto-Merino, D., Edwards, P., Cleland, J., Stevens, G., & Roberts, I. (2012). The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC public health*, 12, 439.
- Wang A, Duan Q, Liu X. *et al.* (2015) All-trans retinoic acid modulates the balance of ADAMTS13 and VWF in human micro-vascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 102,6-10
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., ... Chai, Z. (2007). Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, 168(2), 176–185.
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*, 49(2), 97-107.
- Warhurst, D. C., Steele, J., & et al. (2003). Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, in agreement with its physicochemical properties. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 188–193.
- Warner, N. C., Vaughan, L. B., & Wenzel, R. P. (2016, October). Human immunodeficiency virus associated thrombotic thrombocytopenic purpura, a clinical conundrum. *Journal of clinical apheresis*, 32(6), 567-570.
- Waters, A. M., & Licht, C. (2011). AHUS caused by complement dysregulation: New therapies on the horizon. *Pediatric Nephrology*, 26(1), 41–57.
- Watson, P. R., Guthrie, T. H. J., & Caruana, R. J. (1989). Cisplatin-associated hemolytic-uremic syndrome. Successful treatment with a staphylococcal protein A column. *Cancer*, 64(7), 1400–1403.
- Weiss, H. J., & Turitto, V. T. (1979). Prostacyclin (prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood*, 53(2), 244–250.
- Westwood J.P., Langley, K., Heelas, E., Machin, S.J., Scully, M. (2014) Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol.*;164(6):858-66.
- Windberger, U., Bartholovitsch, A., Plasenzetti, R., Korak, K. J., & Heinze, G. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: Reference values and comparison of data. *Experimental Physiology*, 88(3), 431-440.

- Wohner, N., Kovacs, A., Machovich, R., & Kolev, K. (2012). Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thrombosis research*, 129(4), e41-6.
- Wohner, N., Legendre, P., Casari, C., Christophe, O. D., Lenting, P. J., & Denis, C. V. (2015). Shear stress-independent binding of von Willebrand factor-type 2B mutants p.R1306Q & p.V1316M to LRP1 explains their increased clearance. *JTH*, 13(5), 815–820.
- Wu, D., Vanhoorelbeke, K., Cauwenberghs, N., Meiring, M., Depraetere, H., Kotze, H. F., & Deckmyn, H. (2002). Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood*, 99(10), 3623–3628.
- Wu, T., Yang, S., Haven, S., Holers, V. M., Lundberg, A. S., Wu, H., & Cataland, S. R. (2013). Complement Activation and Mortality During an Acute Episode of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *JTH*, 1925–1927.
- Xiang, J., Fangchao, Y., Bing, W., Yongqiang, W., Shuhua, C., & Yuliang, W. (2015). [Thrombocytopenia induced by lipopolysaccharide may be not related to co-agulation and inflammatory response]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 27(9), 754–758.
- Xu, J., Zhang, X., Monestier, M., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular Histones Are Mediators of Death through TLR2 and TLR4 in Mouse Fatal Liver Injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(5), 2626–2631.
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., ... Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine*, 15(11), 1318–1321.
- Yang, S. T., Wang, X., Jia, G., Gu, Y., Wang, T., Nie, H., ... Liu, Y. (2008). Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicol Lett*, 181(3), 182–189.
- Yata, Y., Miyagiwa, M., Inatsuchi, S., Hiraiwa, Y., Murakami, J., Kato, T., ... Watanabe, A. (2000). Thrombotic thrombocytopenia purpura caused by piper-acillin successfully treated with plasma infusion. *Ann Hematol*, 79(10), 593–595.
- Yates, S., Matevosyan, K., Rutherford, C., Shen, Y.-M., & Sarode, R. (2014). Bortezomib for chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report. *Transfusion*, 54(8), 2064–2067.
- Yilmaz, V. T., Kocak, H., Avci, A. B., Salim, O., Ersoy, F. F., & Suleymanlar, G. (2011). Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with everolimus use in a renal transplant patient. *International urology and nephrology*, 43(2), 581–584.
- Zakarija, A., Bandarenko, N., Pandey, D. K., Auerbach, A., Raisch, D. W., Kim, B., ... Bennett, C. L. (2004). Clopidogrel-Associated TTP An Update of Pharmacovigilance Efforts Conducted by Independent Researchers, Pharmaceutical Suppliers, and the Food and Drug Administration. *Stroke*, 35(2), 533–537.
- Zakarija, A., & Bennett, C. (2005). Drug-Induced Thrombotic Microangiopathy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(06), 681–690.
- Zakarija, A., Kwaan, H. C., Moake, J. L., Bandarenko, N., Pandey, D. K., McKoy, J. M., ... Bennett, C. L. (2009). Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): review of clinical, laboratory, epidemiological, and

- pharmacovigilance findings (1989-2008). *Kidney Int Suppl*, (112), S20-4.
- Zamir, D., Polychuck, I., Leibovitz, I., Reitblat, T., Ducach, A., & Lugassy, G. (2004). Thrombotic thrombocytopenic purpura due to alcohol binge drinking. *European journal of internal medicine*, 15(4), 262–263.
- Zeigler, Z. R., Shadduck, R. K., Nemunaitis, J., Andrews, D. F., & Rosenfeld, C. S. (1995). Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy: a case series. *Bone Marrow Transplant*, 15(2), 247–253.
- Zhang, H.-Z., Kim, M. H., Guo, L.-Z., & Serebruany, V. (2017). CYP2C19 but not CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, PON1 or P2Y12 genetic polymorphism impacts antiplatelet response after clopidogrel in Koreans. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 28(1), 56–61.
- Zhao, L., Ohtaki, Y., Yamaguchi, K., Matsushita, M., Fujita, T., Yokochi, T., ... Endo, Y. (2002). LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: Contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood*, 100(9), 3233–3239.
- Zheng, L., Mao, Y., Li, M., Dai, X., Li, B., & Zheng, X. L. (2015). Therapeutic Efficacy of Anfibatide in a Murine Model of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*, 126(23), 659 LP-659.
- Zheng, X. L., Chung, D., Takayama, T. K., Majerus, E. M., Sadler, J. E., & Fujikawa, K. (2001). Structure of von Willebrand Factor-cleaving Protease (ADAMTS13), a Metalloprotease Involved in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *JBC*, 276(44), 41059–41063.
- Zheng, X. L. (2015). ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annual review of medicine*, 66(5), 211–25.
- Zhou, W., Inada, M., Lee, T. P., Benten, D., Lyubsky, S., Bouhassira, E., ... Tsai, H. M. (2005). ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest*, 85(6), 780–788.
- Zhou, Y.-F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., & Springer, T. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Thombosis and Hemostasis*, 120(2), 449–458.
- Zhu, J., Zhu, J., Bougie, D., Aster, R., & Springer, T. (2015). Structural basis for quinine-dependent antibody binding to platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ . *Blood*, 126(18), 2138–2145.
- Zupancic, M., Shah, P. C., & Shah-khan, F. (2007). Gemcitabine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura, *Lancet Oncol*. 8(July), 20–25.

## Anhang

### Weitere Trigger der TTP im Überblick

Folgend sind verschiedene publizierte TTP-assoziierte Fälle und die dazugehörigen Quellen angegeben. Die Tabelle stellt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Tabelle 16: Tabelle mit Triggern der TTP. „na“ steht für nicht angegeben, „?“ für „Verdacht auf“, wenn die Autoren der Publikation lediglich vermuten, dass es sich um einen Trigger handeln könnte.

| Trigger                                  | Anzahl beschriebener Fälle                     | Quelle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Thrombozytenaggregationshemmer</b>    |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>-Thienopyridine</b>                   |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Ticlopidin                               | 22<br>97<br>1<br>1<br>1<br>13<br>40<br>60<br>4 | Bennett 2013 (Bennett et al. 2013)<br>Jacob et al 2012(Jacob et al., 2012) FDA review bis 2011<br>Matsuda 2006 (Matsuda et al., 2006)<br>Türken et al 2003 (Turken et al., 2003)<br>Naseer 2001 (Naseer et al., 2001)<br>Chen1999 (Chen et al., 1999)<br>Bennett 1999 (Bennett et al., 1999)<br>Bennett 1998 (Bennett et al., 1998)<br>Page 1991 (Page et al., 1991) |
| Clopidogrel                              | 1<br>1<br>1<br>1<br>50<br>197                  | Khodor 2016 (Khodor et al., 2016)<br>Ishikawa 2012 (Ishikawa et al., 2012)<br>Karkowski 2011 (Karkowski et al., 2011)<br>Fukusako 2007 (Fukusako et al., 2007)<br>Zakarija 2004 (1998-2002) (Zakarija et al., 2004)<br>Jacob 2012 (FDA 1998-2011) (Jacob et al., 2012)                                                                                               |
| Prasugrel                                | 14                                             | Jacob 2012 (FDA 1998-2011) (Jacob et al., 2012)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>-Andere</b>                           |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Defibrotid                               | na                                             | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Dipyridamol                              | na<br>na                                       | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Lindquist 1981 (Lindquist & George, 1981)                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Immunsuppressive Medikamente</b>      |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Cyclosporin                              | 3<br>15<br>1<br>1 (HUS)<br>1                   | Sabater et. Al 2016 (Sabater et al., 2016)<br>Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Gupta 2005 (Gupta et al., 2005)<br>Lapointe 1999 (Lapointe et al.,1999)<br>Pratt 1999 (Pratt et al., 1999)                                                                                                                                                                          |
| Tacrolimus (FK506)                       | 4 (TMA)<br>1<br>1<br>1<br>1                    | Reese 2015 (Reese et al., 2015)(Oklahoma registry)<br>Maramattom 2015 (Maramattom et al. 2015)<br>Go 2008 (Go et al., 2008)<br>Boctor FN 2006 (Boctor et al., 2013)<br>Tezcan 1998 (Tezcan et al., 1998)                                                                                                                                                             |
| OKT3, Muromonab-CD3, Antikörper          | na<br>na                                       | Erwähnt in Pisoni 2001 (Pisoni et al., 2001)<br>Erwähnt Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Sirolimus                                | 8 (TMA)<br>3<br>1                              | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Eyzaguirre 2005 (Eyzaguirre et al., 2017)<br>Crew 2005 (Crew et al., 2005)                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Everolimus (Derivat von Sirolimus)       | 2 (TMA)                                        | Yilmaz 2011 (Yilmaz et al., 2011)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Nichtsteroidale Entzündungshemmer</b> |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Piroxicam                                | na                                             | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                                      |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                      | na                                               | Giordano 1987 (Giordano et al., 1987)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Diclofenac                           | na<br>1                                          | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Bondeson et al. 1991 (Bondeson et al., 1991)                                                                                                                                                                                                                               |
| Ketorolac                            | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Ibuprofen                            | 1<br>1<br>na                                     | Oregel 2013 (Oregel, Ramdial, & Gluck, 2013)<br>Benmoussa 2016 (Benmoussa et al., 2016)<br>Catizone 1974 (Catizone et al., 1974)                                                                                                                                                                                           |
| Nimesulide                           | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Salicylamid                          | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Immunmodulatoren</b>              |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Interferon Beta                      | 4 (+6) (TMA)<br><br>3<br>1<br>1<br>1 (TMA)<br>na | Hunt 2014 (in Kombination mit Bluthochdruck)<br>(Hunt et al., 2014)<br>Larochelle 2014 (Larochelle et al., 2014)<br>Poddar 2013 (Poddar & Wang, 2013)<br>Ding 2016 (Ding, Qian, Zhang, & Wu, 2016)<br>Gerischer 2016 (Gerischer et al., 2016)<br>Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                         |
| Interferon Alpha                     | 6 (TMA)<br>1 (TMA)<br><br>1<br>1<br>1<br>na      | Galesic 2006 (Galesic et al., 2006)<br>Lambot, 2010 (in Kombination mit Hepatitis C)<br>(Lambot et al., 2010)<br>Lacotte 2000 (Lacotte et al., 2000)<br>Deutsch et al 2007 (Deutsch et al., 2009)<br>Kitano 2006 (in Kombination mit Hepatitis C)<br>(Kitano et al., 2006)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001) |
| <b>Antibiotika</b>                   |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Ciproflaxcin (Fluorchinolon)         | 1<br>1<br>1 (TMA)<br>1 (ITP?)<br>1 (HUS)         | Mouraux 2002 (Mouraux et al., 2002)<br>Hashmi 2015 (Hashmi et al., 2015)<br>Tuccori 2008 (Tuccori et al., 2008)<br>Cheah 2009 (Cheah et al., 2009)<br>Allan 2002 (Allan et al., 2002)                                                                                                                                      |
| Penicillin                           | na<br>na                                         | Erwähnt in FDA 2011 (Jacob et al., 2012)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Piperacillin                         | 1                                                | Yata et al 2000 (Yata et al., 2000)                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Pencillamine                         | 1<br>na<br>1                                     | Ahmed 1978 (Ahmed et al., 1978)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Trice 1983 (Trice, Pinals, & Plitman, 1983)                                                                                                                                                                                             |
| Rifampicin                           | na<br>1<br>1                                     | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Gupta 2005 (Gupta & Wargo, 2005)<br>Fahal 1992 (Fahal et al., 1992)                                                                                                                                                                                                        |
| Cephalosporin                        | 3<br>1                                           | Patel 2016 (Patel & Amber, 2016)<br>Baron 2003 (Baron et al., 2003)                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Oxytetracycline                      | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Trimethoprim-sulfamethoxazol         | 1 (TMA)<br>1<br>1                                | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Bapani 2013 (Bapani et al., 2013)<br>Martin 2007 (Martin et al., 2007)                                                                                                                                                                                                                  |
| Ampicillin                           | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Sulfisoxazol                         | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Metronidazol                         | 1<br>na                                          | Rivkin 2007 (Rivkin, 2007)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Clarithromycin                       | 1<br>na                                          | Alexopoulou 2002 (Alexopoulou et al., 2002)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Impfstoffe</b>                    |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Hepatitis-B                          | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Influenza                            | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| DPT (Diphtherie, Pertussis, Tetanus) | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| TAB (Typhus-Paratyphus)              | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| MMR (Masern-Mumps-Röteln Impfung)    | na                                               | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Chemotherapeutika</b>             |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Gemcitabin                           | 2 (TMA)                                          | Richmond 2013 (Richmond et al., 2013)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|                                |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0.015% to 1.4% Inzidenz        | 1<br>1<br>3 (TMA)<br>9 (TMA)<br>na<br>12 (HUS)      | Kasi 2011 (Kasi, 2011)<br>De Smet 2008 (De Smet et al., 2008)<br>Izzedine 2006 (Izzedine et al., 2006)<br>Humphreys 2004 (Humphreys et al., 2004)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Fung 1999 (Fung et al., 1999)                                                                                |
| Mitomcyin                      | 11 (TMA)<br>1<br>1<br>1<br>1<br>1<br>na<br>52 (HUS) | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Shah 2013 (N. Shah et al., 2013)<br>El-Ghazal 2011 (El-Ghazal et al., 2011)<br>Hong 2011 (Hong et al., 2011)<br>Onitilo 2009 (Onitilo et al., 2017)<br>Kasper 2007 (Kasper et al., 2007)<br>Erwähnt in Bukowski 1985 (Bukowski, 1985)<br>Cantrell 1985 (Cantrell et al., 1985) |
| Carmustine                     | na<br>1                                             | George 2010 (George, 2010)<br>Veseley 2003 (Vesely et al., 2003)                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Oxaliplatin                    | 2 (TMA)<br>1<br>1 (HUS)                             | Erwähnt in Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Mancano 2014 (Mancano, 2014)<br>Alberts 2003 (in Kombination mit Gemcitabin)<br>(Alberts et al., 2003)                                                                                                                                                              |
| Carboplatin                    | na<br>na                                            | Iams 2013 (in Kombination mit Docetaxel and Trastuzumab) (Iams et al., 2013)<br>Walker 1989 (Walker et al., 1989)                                                                                                                                                                                                 |
| Deoxycoformycin                | na<br>1 (HUS)                                       | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Sakai 1995 (Sakai et al., 1995)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Fluorouracil                   | na<br>na<br>10 (HUS)                                | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Lesesne 1989 (Lesesne et al., 1989)<br>Cantrell 1985 (in Kombination mit Adriamycin und Mitomycin C) (Cantrell et al., 1985)                                                                                                                                      |
| Tretinoin                      | 1                                                   | Fujita 2003 (Fujita et al., 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hydroxyurea                    | na                                                  | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Zinostatin                     | na (HUS)                                            | Sheldon 1986 (Sheldon & Slaughter, 1986)                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Estramustin                    | 1                                                   | Byrnes 1986 (Byrnes et al., 1986)                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Doxorubicin                    | 3 (HUS)                                             | Cantrell 1985 (in Kombination mit Fluorouracil und Mitomycin C) (Cantrell et al., 1985)                                                                                                                                                                                                                           |
| Vinblastin                     | 1 (HUS)<br>1 (HUS?)                                 | Lesesne 1989 (in Kombination mit (Lesesne et al., 1989)<br>Harrell 1982 (in Kombination mit Bleomycin und Vincristin) (Harrell, Sibley, & Vogelzang, 1982)                                                                                                                                                        |
| Chlorozotocin                  | na<br>1 (MAHA)                                      | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Kressel 1981 (Kressel et al., 1981)                                                                                                                                                                                                                               |
| Cytarabin                      | 1                                                   | Regragui 2012 (in Kombination mit Daunorubicin) (Regragui et al., 2012)                                                                                                                                                                                                                                           |
| Sunitinib                      | 2 (TMA)<br>1?(TTP-HUS)<br>1 (TMA)<br>1 (TMA)        | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Choi 2008 (Choi et al., 2008)<br>Kapiteijn 2007 (Kapiteijn et al., 2007)<br>Frangie 2007 (Frangie et al., 2007)                                                                                                                                                                |
| Docetaxel                      | 1 (TMA)<br>1 (TMA)<br>1 (HUS)                       | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Iams 2013 (in Kombination mit Carboplatin und Trastuzumab) (Iams et al., 2013)<br>Citarrella 2002 (in Kombination mit Gemcitabin) (Citarrella et al., 2002)                                                                                                                    |
| Vincristin                     | 1 (TMA)                                             | Reese 2015 (Reese et al., 2015)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Bleomycin/Cisplatin/Vincristin | 1 (HUS)<br>3 (MAHA)                                 | Gardner 1989 (Gardner et al., 1989)<br>Sheldon 1986 (Sheldon & Slaughter, 1986)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Daunorubicin                   | na<br>1                                             | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Byrnes 1986 (in Kombination mit Cytarabin) (Byrnes et al., 1986)                                                                                                                                                                                                  |
| Cisplatin                      | 1(HUS)<br>2 (HUS)                                   | Lesesne 1989 (in Vbdg mit Vinblastin und Bleomycin) (Lesesne et al., 1989)<br>Watson 1989 (Watson et al., 1989)                                                                                                                                                                                                   |
| Vancomycin                     | na                                                  | George 2010 (James N George, 2010)                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Bevacizumab                    | 3 (TMA)<br>na<br>1                                  | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Oregel 2013 (Oregel et al., 2013)<br>Nishijima 2013 (in Kombination mit Gemcitabin) (Nishijima et al., 2013)                                                                                                                                                                   |

|                                            |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                            | 3                                                                              | Bayraktar 2010 (Bayraktar et al., 2010)                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Chinine</b>                             |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Chinin                                     | 63 (TMA)<br>1 (HUS-TTP)<br>17 (TTP-HUS)<br>1 (HUS)<br>1 (ITP)<br>3 HUS         | Reese 2015 review (Oklahoma Registry 1989-2014) (Reese et al., 2015)<br>Baliga 2003 (Baliga & Wingo, 2003)<br>Kojouri 2001 (Kojouri et al., 2001)<br>Crum 2000 (Nancy F Crum & Gable, 2000)<br>Glynne 1999 (Glynne et al., 1999)<br>Gottschall 1991 (Gottschall et al., 1991)<br>Und weitere Publikationen |
| Mefloquin                                  | 1                                                                              | Fiaccadori 2006 (Fiaccadori et al., 2006)                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Hydroxychloroquine                         | 1 Thrombozytopenie<br>1 (vermutet)<br>1 Thrombozytopenie                       | Demir 2014 (Demir et al., 2014)<br>Mar 2011 (Mar et al., 2011)<br>Vazquez 2016 (Anton Vazquez et al., 2016)                                                                                                                                                                                                |
| <b>Autoimmunerkrankungen</b>               |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Lupus erythematoses (SLE)                  | 1<br>1<br>2<br>1<br>40<br>8                                                    | Thampi 2011 (Thampi et al., 2011)<br>Maruoka 2007 (Maruoka et al., 2007)<br>Starck 2005 (Starck et al., 2005)<br>Chak 2003 (Chak et al., 2003)<br>Musio et. Al, 1998; (Musio et al., 1998)<br>Bray 1994 (Bray et al., 1994)                                                                                |
| Antiphospholipid Syndrom                   | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Rheumatoide Arthritis                      | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Polyarteritis                              | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Sclerodermie                               | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Myasthenia gravis                          | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Polymyositis                               | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Sjögren's Syndrom                          | na                                                                             | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Entzündungen</b>                        |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Pankreatitis                               | 7                                                                              | McDonald 2009 (McDonald et al., 2009)                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Infektionen</b>                         | 31                                                                             | Booth et al 2012 (Booth et al., 2012)                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>-Bakterielle Infektion</b>              |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Mycoplasma pneumoniae                      | 1                                                                              | Bar 2000 (Bar et al., 2000)                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Streptokokken                              | 1<br>1<br>1 (TMA)                                                              | Schriber 1993 (Schriber et al., 1993)<br>Morrin 2006 (Morrin et al., 2006)<br>Myers 1993 (Myers & Marrie, 1993)                                                                                                                                                                                            |
| Borrelia burgdorferi                       | 1                                                                              | Schröder 1995 (Schroder et al., 1995)                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Brucella                                   | 1<br>1<br>1(TMA)<br>1<br>1                                                     | Kurtaran 2011 (Kurtaran et al., 2011)<br>Akbayram 2011 (Akbayram et al., 2011)<br>Kupermann 2010 (Kuperman et al., 2010)<br>Kiki 2008 (Kiki et al., 2008)<br>Erdem 2007 (Erdem et al., 2007)                                                                                                               |
| Leptospira                                 | 1                                                                              | Sükran 2013 (Sükran et al., 2013)                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Capnocytophaga canimorsus (Flavobakterium) | 1<br>1<br>1 (HUS)<br>1<br>1(TTP-ähnlich)<br>1 (TTP-ähnlich)<br>1 (TTP-ähnlich) | Ma 2013 (Ma & Goetz, 2013)<br>Brichacek et al. 2012 (Brichacek et al., 2012)<br>Mulder 2001 (Mulder et al., 2001)<br>Kok et al 1999 (Kok et al., 1999)<br>Quilichini 1998 (Quilichini et al., 1998)<br>Finn 1996 (Finn, Dale, & Isles, 1996)<br>Scarlett 1991 (Scarlett et al., 1991)                      |
| <b>-virale Infektionen</b>                 |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Hepatitis C                                | 1<br>1                                                                         | Lotta 2013 (Lotta et al., 2013)<br>Mak 2009 (Mak et al., 2009)                                                                                                                                                                                                                                             |
| HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)         | 1<br>1<br>1<br><br>1<br><br>5<br>2                                             | Warner 2016 (Warner et al., 2016)<br>Rakhmanina 2014 (Rakhmanina et al. 2014)<br>Michaux 2013, in Kombination mit Interferon α (Michaux et al., 2013)<br>Kurtaran 2011 mit Brucellose (Kurtaran et al., 2011)<br>Blazes 2004 (Blazes & Decker, 2004)<br>De Man 1997 (de Man et al., 1997)                  |
| Dengue-Virus                               | 1                                                                              | Deepanjali 2015 (in Kombination mit Schwangerschaft) (Deepanjali et al., 2015)                                                                                                                                                                                                                             |

|                                                            |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CMV(Zytomegalievirus)                                      | 1 (TMA)<br>1 (TMA)<br>na (TMA)                                                      | Mitsuiki 2017 (Mitsuiki et al., 2017)<br>Java 2015 (Java et al., 2015)<br>Ramasubbu 2003 (Ramasubbu et al., 2003)                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Krebs (allgemein)</b>                                   | na (TMA)                                                                            | Babu 2016 (Babu et al., 2016)                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Krebs:Leiomyosarcoma                                       | 1                                                                                   | Karti 2003 (Karti et al., 2003)                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Krebs: Brustkrebs                                          | 4 (ITP)                                                                             | Samimi 2010 (Samimi, Mirkheshti, Heidarpour, & Abdollahi, 2010)                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Transplantation</b>                                     | 1 (TMA)<br>1 (TMA)<br>1 (TMA)<br>na (TMA)                                           | Noris 2010 (M. Noris & Remuzzi, 2010)<br>Basic-Jukic 2008 (Basic-Jukic et al., 2008)<br>Ponticelli 2006 (Ponticelli & Banfi, 2006)<br>Hochstetler 1994 (Hochstetler et al., 1994)                                                                                                                                              |
| Knochenmark Transplantation<br>(Stammzell Transplantation) | na<br>1 (TTP-ähnlich)<br>1<br><br>na (TMA)<br>1 (TMA)<br>1 (TMA)<br><br>8 (HUS-TTP) | Allford 2002 (Allford, Bird, & Marks, 2002)<br>Roy 2001 (Roy et al., 2001)<br>Gonzalez-Vicent 1999 (Gonzalez-Vicent et al., 1999)<br>Moake 1996 (Moake & Byrnes, 1996)<br>Zeigler 1995 (Zeigler et al., 1995)<br>Pettitt 1994 (in Kombination mit Cyclosporinen)<br>(Pettitt & Clark, 1994)<br>Silva 1991 (Silva et al., 1991) |
| <b>Antifungizide</b>                                       |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Micafungin<br>Echinocandine                                | 1                                                                                   | Nazzal 2011 (Nazzal et al., 2011)                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Sonstige</b>                                            |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Alkohol                                                    | 1<br>2<br>1<br>na                                                                   | Scully 2016 (Scully et al., 2016)<br>Deford 2013 (Deford et al., 2013)<br>Zamir 2004 (Zamir et al., 2004)<br>Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)                                                                                                                                                                                     |
| Ipilimumab                                                 | na                                                                                  | 2017 King (King, de la Cruz, & Lutzky, 2017)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Oxymorphon (Opioide)                                       | 1<br>1<br>1<br><br>1<br>na<br>na                                                    | Kotbi 2015 (Kotbi, Han, Cheng, & Odom, 2015)<br>Kapila 2014 (Kapila et al., 2014)<br>Tennessee Department of Health 2014 (Kapila et al., 2014)<br>Amjad 2013 (Amjad & Parikh, 2013)<br>Erwähnt in Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>uvm                                         |
| Albendazole                                                | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Tetrachlormethan                                           | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Methapyrilene (Antihistamin)                               | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 s.o.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Valaciclovir (Virostatika, Nukleosidanalogon)              | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 s.o.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Kokain                                                     | 1 (MAHA)<br>1 (TMA)<br>1 (TMA)<br><br>1 (MAHA)                                      | Odrionic 2014 (Odrionic et al., 2014)<br>Volcy 2000 (Volcy et al., 2000)<br>Alcazar-Guijo 2005 (in Kombination mit Pankreatitis) (Alcazar-Guijo et al., 2005)<br>Keung 1996 (Keung, Morgan, & Cobos, 1996)                                                                                                                     |
| Heroin                                                     | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Echinacea (Immunstimulanz)                                 | 1                                                                                   | Liatsos 2006 (Liatsos et al., 2006)                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Quetiapin                                                  | 1<br>1 (TMA)<br>1                                                                   | Husnain 2016 (Husnain et al., 2016)<br>Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Huynh 2005 (Huynh, Chee, & Lau, 2005)                                                                                                                                                                                                                |
| Sulfisoxazole                                              | 1 (TMA)<br>1                                                                        | Reese 2015 (Reese et al., 2015)<br>Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Trielina                                                   | 1 (TMA)                                                                             | Reese 2015 (Reese et al., 2015)                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Pentostatin                                                | 2 (TMA)                                                                             | Reese 2015 (Reese et al., 2015)                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Simvastatin                                                | na<br>1                                                                             | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Koduri 1998 (Rao Koduri, 2017)                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Fluvastatin                                                | na                                                                                  | Erwähnt in v. Auer 2008 (von Auer et al., 2008)                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Famotidine (Histamine H2 Rezeptor-Antagonist)              | na<br>1                                                                             | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Kallal 1996 (Kallal & Lee, 1996)                                                                                                                                                                                                                                               |
| Cimetidine                                                 | na                                                                                  | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

| Hormone                                |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| orale Kontrazeptiva<br>Schwangerschaft | na<br>na<br>1<br><br>na<br>na<br><br>1<br>1 | George 2015 (Schwangerschaft) (George, Nester, & McIntosh, 2015)<br>Fujimura 2011 (Fujimura et al., 2011) (Schwangerschaft)<br>Stylianou 2009 (Stylianou et al., 2009)<br>Lopez Izquierdo 1999 (Lopez Izquierdo et al., 1999)<br>McShane 1993 (McShane et al., 1983)<br>Holdrinet 1983 (Holdrinet et al., 1983) |
| konjugierte Östrogene                  | na<br>na                                    | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Tamoxifen                              | na<br>na<br><br>9(HUS)                      | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)<br>Erwähnt in von Auer 2008 (von Auer et al., 2008)<br>Montes 1993 (Montes et al., 1993)                                                                                                                                                                                          |
| Medroxy progesteron                    | na (MAHA)                                   | Sheldon 1986 (Sheldon & Slaughter, 1986)                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Danazol                                | na<br>na                                    | Furlan 2003 (M. Furlan, 2003)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                   |
| 17-Beta estradiol                      | na<br>na                                    | Stylianou 2009 (Stylianou et al., 2009)<br>Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                         |
| Ethinodiol acetate                     | na<br>1                                     | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>McShane 1983 (McShane et al., 1983)                                                                                                                                                                                                                             |
| Levonorgesterol                        | na<br>1                                     | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)<br>Fraser 1996 (Fraser et al., 1996)                                                                                                                                                                                                                               |
| Norethisterone                         | na                                          | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Ethinyl estradiol                      | na                                          | Erwähnt in Medina 2001 (Medina et al., 2001)                                                                                                                                                                                                                                                                    |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Einteilung der TTP in die typische primäre und die sekundäre TTP. ....                                                             | 3  |
| Abbildung 2: Typische Petechien am Unterschenkel eines TTP-Patienten. ....                                                                      | 5  |
| Abbildung 3: Blutausstrich mit Fragmentozyten bei einem TTP-Patient, entnommen aus Poddar (Poddar & Wang, 2013) .....                           | 6  |
| Abbildung 4: Domänenstruktur des Von-Willebrand-Faktors nach Zheng 2015 .....                                                                   | 9  |
| Abbildung 5: Die Rolle von VWF und ADAMTS13 in der Hämostase. ....                                                                              | 10 |
| Abbildung 6: Domänenstruktur von ADAMTS13 .....                                                                                                 | 13 |
| Abbildung 7: Isoformen des ADAMTS13-Gens in Mäusen. ....                                                                                        | 15 |
| Abbildung 8: Struktur eines Lipopolysaccharids .....                                                                                            | 21 |
| Abbildung 9: Strukturformel von Hydroxychloroquin. ....                                                                                         | 22 |
| Abbildung 10: Strukturformel von Ticlopidin .....                                                                                               | 23 |
| Abbildung 11: Strukturformel von Gemcitabin .....                                                                                               | 24 |
| Abbildung 12: Strukturformel von Mitomycin C. ....                                                                                              | 25 |
| Abbildung 13: Schema der Rückkreuzung. ....                                                                                                     | 30 |
| Abbildung 14: Korrelation nach Pearson. ....                                                                                                    | 39 |
| Abbildung 15: Gießen des Multimergels. ....                                                                                                     | 44 |
| Abbildung 16: Gelbild zur Genotypisierung der ADAMTS13KO-Mäuse. ....                                                                            | 47 |
| Abbildung 17: VWF-Multimer gel mit VWF-Banden. ....                                                                                             | 47 |
| Abbildung 18: Vergleich der Plättchenzahl nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. ....                                                              | 49 |
| Abbildung 19: Vergleich des Hämoglobinwerts nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. ....                                                            | 49 |
| Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von Troponin I nach Injektion mit 800 IE/kg rhVWF. ....                                               | 50 |
| Abbildung 21: Vergleich der LDH-Konzentration zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 800 IE rhVWF/kg. ....                   | 50 |
| Abbildung 22: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. ....                           | 51 |
| Abbildung 23: Vergleich des Hämoglobinwerts nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. ....                                                            | 51 |
| Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. .... | 52 |
| Abbildung 25: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 500 IE/kg rhVWF. ....              | 53 |
| Abbildung 26: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. ....   | 53 |
| Abbildung 27: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Gabe von 250 IE/kg rhVWF. ....           | 54 |
| Abbildung 28: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF ..... | 54 |
| Abbildung 29: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF .....         | 55 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 30: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. ....                   | 55 |
| Abbildung 31: Vergleich des Hämoglobinwerts bei WT- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. ....                      | 56 |
| Abbildung 32: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. ....                | 56 |
| Abbildung 33: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach i.v. Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin. ....     | 57 |
| Abbildung 34: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 8 h nach i.v. Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin®. ....       | 57 |
| Abbildung 35: Vergleich der Konzentration von kardialen Troponin I (cTnI) zwischen WT- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 500 IE/kg Wilfactin®. .... | 58 |
| Abbildung 36: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor und 2h nach Injektion mit 800 IE/kg Kogenate®. ....           | 58 |
| Abbildung 37: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 800 IE/kg Kogenate®. ....                             | 59 |
| Abbildung 38: Vergleich der Konzentration von cTnI zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 800 IE/kg Kogenate®. ....                    | 59 |
| Abbildung 39: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg Histonen. ....                | 60 |
| Abbildung 40: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 15 min nach Gabe von 50 mg/kg Histonen. ....                        | 61 |
| Abbildung 41: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg Histonen. ....  | 61 |
| Abbildung 42: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 30 min nach i.v. Injektion mit 50 mg/kg KG Histonen. ....       | 62 |
| Abbildung 43: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 30 min nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen. ....           | 62 |
| Abbildung 44: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 25 mg/kg Histonen. ....                               | 63 |
| Abbildung 45: Vergleich der LDH-Konzentration zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen. ....                      | 63 |
| Abbildung 46: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach i.v. Injektion mit 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF. ....           | 64 |
| Abbildung 47: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 50 mg/kg Histonen. ....                               | 64 |
| Abbildung 48: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 2 Tage vor Versuchsbeginn und 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS. ....   | 65 |
| Abbildung 49: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.v. Injektion von 2 mg/kg LPS. ....                       | 66 |
| Abbildung 50: Vergleich der LDH-Konzentration bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS. ....                             | 66 |

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 51: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.v. Injektion mit 2 mg/kg LPS und 8 h nach zusätzlicher Gabe von 100 IE/kg rhVWF. .... | 67 |
| Abbildung 52: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach Gabe von 2 mg/kg LPS und insgesamt 8 h Gabe von 100 IU/kg rhVWF. ....                 | 67 |
| Abbildung 53: Vergleich der Plättchenzahl zwischen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS.. ....                                              | 68 |
| Abbildung 54: Vergleich des Hämoglobinwerts bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach i.p. Injektion von 1 mg/kg LPS.. ....                                                     | 69 |
| Abbildung 55: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) in Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS. ....                                       | 69 |
| Abbildung 56: Vergleich der LDH-Konzentration im Plasma von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 5 h nach i.p. Injektion mit 1 mg/kg LPS. ....                                              | 70 |
| Abbildung 57: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®. ....                                                  | 70 |
| Abbildung 58: Vergleich des Hämoglobinwerts bei WT-Mäusen und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 6,5 mg/kg Quensyl®. ....                                                        | 71 |
| Abbildung 59: Vergleich der Konzentration von kardialen Troponin I (cTnI) zwischen Wildtyp (WT)- und ADAMTS13KO-Mäusen 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®. ....                | 71 |
| Abbildung 60: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 3 h nach Injektion mit 6,5 mg/kg Quensyl®. ....                                                      | 72 |
| Abbildung 61: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von 10 mg/kg Ticlopidin und Injektion von 100 IE/kg rhVWF. ....                        | 72 |
| Abbildung 62: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF. ....                                             | 73 |
| Abbildung 63: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit Ticlopidin und 100 IE/kg rhVWF. ....                            | 73 |
| Abbildung 64: Vergleich der LDH-Konzentration nach Gabe von Ticlopidin. ....                                                                                                          | 74 |
| Abbildung 65: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Injektion mit 50 mg/kg Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF. ....                                 | 74 |
| Abbildung 66: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Gabe von Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF. ....                                             | 75 |
| Abbildung 67: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von Gemcitabin und 100 IE/kg rhVWF. ....                                 | 75 |
| Abbildung 68: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach 5 tägiger Behandlung. ....                                                                      | 76 |
| Abbildung 69: Vergleich der Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und 8 h nach Injektion mit 8 mg/kg Mitomycin. ....                                                   | 82 |
| Abbildung 70: Vergleich des Hämoglobinwerts von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen vor und nach Injektion mit 8 mg/kg Mitomycin. ....                                                     | 77 |
| Abbildung 71: Vergleich der Konzentration von Troponin I (cTnI) bei Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Injektion mit Mitomycin. ....                                             | 77 |

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 72: Vergleich der LDH-Konzentration von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen 8 h nach Gabe von Mitomycin. ....        | 78  |
| Abbildung 73: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 800 IE/rhVWF. ....                     | 80  |
| Abbildung 74: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 250 IE/kg rhVWF. ....                  | 81  |
| Abbildung 75: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 100 IE/kg rhVWF. ....                  | 81  |
| Abbildung 76: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 25 mg/kg Histonen. ....                | 82  |
| Abbildung 77: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Gabe von 25 mg/kg Histonen und 100 IE/kg rhVWF. .... | 82  |
| Abbildung 78: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 2 mg/kg LPS und 100 IE/kg rhVWF. ....  | 83  |
| Abbildung 79: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit 1 mg/kg LPS. ....                      | 83  |
| Abbildung 80: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit Quensyl®. ....                         | 84  |
| Abbildung 81: Blutausstriche von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen nach Injektion mit Gemcitabin. ....                       | 84  |
| Abbildung 82: Plättchenzahl von Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen in Abhängigkeit vom Alter. ....                            | 85  |
| Abbildung 83: Plättchenzahl in Abhängigkeit vom Gewicht der Maus. ....                                                    | 86  |
| Abbildung 84: Vergleich der Plättchenzahl von weiblichen und männlichen Wildtyp- und ADAMTS13KO-Mäusen. ....              | 87  |
| Abbildung 85: Gelelektrophoretische Auftrennung des VWFs im Multimergele aus Ebner 2015. ....                             | 93  |
| Abbildung 86: Bakterien, welche sich in NETs verfangen haben. ....                                                        | 98  |
| Abbildung 87: Das Komplementsystem nach Noris et al. 2013. ....                                                           | 120 |

