



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Mikrofluidische Analyse von scherflussinduzierten Defiziten TTP-assoziiierter ADAMTS13-Mutanten

Masterarbeit
im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology
Fakultät Life Sciences

vorgelegt von
Kristina Kraus,
1940567
Hamburg-Bergedorf
28.02.2014

Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg)

Gutachter: Dr. Maria A. Brehm
(Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

Die Masterthesis wurde in den Laboren der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. R. Schneppenheim für die Möglichkeit bedanken, die Masterthesis im Labor der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum-Eppendorf durchzuführen.

Zusätzlich gilt ein großer Dank Frau Dr. Maria A. Brehm für die Unterstützung, Geduld, anregende Diskussionen und außerordentlich gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Auch danke ich Tobias Obser, Dr. Ulrike Klemm und Dr. Wolf Hassenpflug für die spannenden Diskussionen und Ratschläge während der Durchführung der Masterthesis.

Ferner danke ich auch meiner Schwester Emma Kraus, die stets für mich da war und mich in jeglicher Hinsicht sehr gut unterstützt hat.

Prof. Dr. Gesine Cornelissen danke ich für ihre Bereitschaft sich als Gutachterin zur Verfügung zu stellen und für den Besuch während der Durchführung der Masterthesis.

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Hämostase	1
1.1.1. Primäre Hämostase	2
1.1.2 Sekundäre Hämostase.....	4
1.1.3. Fibrinolyse.....	7
1.2. Der Von-Willebrand-Faktor.....	8
1.3. ADAMTS13	13
1.4. Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura.....	19
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Materialien.....	23
2.1.1. Geräte	23
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3. Chemikalien	24
2.1.4. Verwendete Lösungen und Medien.....	25
2.1.5 Verwendete Vektoren.....	27
2.1.6 Verwendete Antikörper.....	27
2.2. Methoden	28
2.2.1. Kultivierung	28
2.2.1.1. Auftauen eukaryotischer Zellen.....	28
2.2.1.2. Passagieren eukaryotischer Zellen	28
2.2.1.2.1. HEK-293-EBNA-Zellen.....	28
2.2.1.2.2. HUVEC-Zellen.....	29
2.2.1.3. Kultivierung unter Flussbedingungen	30
2.2.2. Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen	30
2.2.3. Lyse der transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen.....	31

2.2.4. Konzentrierung von Mediumproteinen transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen	32
2.2.5. Western Blot.....	32
2.2.6. ADAMTS13-ELISA.....	33
2.2.7. Mikrofluidischer Assay	34
2.2.8. Immunfluoreszenz.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1. Rekombinante Expression von wtADAMTS13 und ADAMTS13-Mutanten	36
3.2. Visualisierung von VWF-Fäden	38
3.3. Mikrofluidischer Assay zum Nachweis des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13.....	43
3.4. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Mutanten der CUB1-Domäne	47
3.5. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Mutanten der TSP1-1-2-Regionen	52
3.6. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Spacer-Domäne	57
3.7. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Disintegrin-Domäne.....	60
3.8. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Metalloprotease-Domäne	61
4. Diskussion	64
4.1. Herstellung von rekombinanten ADAMTS13-Mutanten.....	67
4.2. Einfluss von Mutationen der CUB1-Domäne von ADAMTS13 auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden.....	68
4.3. Einfluss von Mutationen der TSP1-1-2-Regionen von ADAMTS13 auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden.....	70
4.4. Einfluss einer Mutation der Spacer-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden	72

4.5. Einfluss einer Mutation der Disintegrin-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden	73
4.6. Einfluss einer Mutation der Metalloprotease-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden.....	74
4.7. Identifizierung scherabhängiger Störungen der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13-Mutanten	75
5. Zusammenfassung	78
II. Abkürzungsverzeichnis.....	80
III. Drei-Buchstabencode	83
IV. Abbildungsverzeichnis.....	84
V. Tabellenverzeichnis.....	87
VI. Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

Die hereditäre thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP, auch Upshaw-Schulman-Syndrom (USS)) ist eine mikroangiopathische Erkrankung, die durch eine fehlerhafte Funktion einer Protease, die als *a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13* (ADAMTS13) bezeichnet wird, im Blutplasma charakterisiert ist. ADAMTS13 erfüllt durch die Spaltung des multimeren Glykoproteins Von-Willebrand-Faktor (VWF) wichtige Funktionen bei der Regulation der primären Hämostase. Der Von-Willebrand-Faktor wird nach Läsion des Endothels zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten freigesetzt. Durch die Scherkräfte im Blutstrom werden die VWF-Multimere gestreckt, wodurch es zur Freilegung der Bindungsdomänen und der Spaltstelle für ADAMTS13 kommt. Zur Verhinderung einer hyperadhäsiven Wirkung des Von-Willebrand-Faktors schneidet ADAMTS13 diesen nur in der gestreckten Form (Pötzsch, Madlener, 2002, Behrends et al., 2010).

Mutationen innerhalb des ADAMTS13-Gens beeinträchtigen die Aktivität der Protease und führen zu Fehlregulationen des Von-Willebrand-Faktors während der Hämostase (Crawley et al., 2011). Aktuelle diagnostische Tests zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 werden ausschließlich unter statischen und denaturierenden Messbedingungen durchgeführt. Die bei dem enzymatischen Abbau der VWF-Multimere durch ADAMTS13 herrschenden physiologischen Bedingungen werden dabei nicht treffend simuliert. Folglich kann die proteolytische Aktivität von ADAMTS13 nicht immer präzise erfasst werden und es können fehlerhafte Diagnosen bei potenziellen USS-Patienten entstehen, wenn der Patient eine Mutation trägt, die nur unter Scherbedingungen zum Tragen kommt.

1.1. Hämostase

Die Hämostase vereint sämtliche Komponenten, Funktionen und physiologischen Notwendigkeiten, die zur Stillung einer Blutung notwendig sind. Die Blutstillung wird als Reaktion auf Verletzungen des vaskulären Endothels ausgelöst. Das Verletzen des vaskulären Endothels kann durch eine direkte Schädigung des Gefäßes oder durch vaskuläre Krankheiten verursacht werden (Freissmuth, Offermanns, 2012).

Die Hämostase wird in primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. Die primäre Hämostase umfasst die Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion und die Thrombozytenaggregation. Das Ziel der primären Hämostase ist die Bildung eines Thrombozytenpfropfs (weißer Thrombus) und die Vasokonstriktion zur Vermeidung eines akuten Blutverlusts (Behrends et al., 2010).

Die sekundäre Hämostase basiert auf einem grundlegenden Mechanismus des plasmatischen Gerinnungssystems. Sie unterteilt sich in Aktivierungsphase, Koagulationsphase und Retraktionsphase. Das Ziel der sekundären Hämostase ist der beständige Wundverschluss durch Bildung eines Fibrinnetzes aus Fibrinogen sowie die Bildung des roten Thrombus durch Einlagerung von Blutzellen in das Fibrinnetz (Behrends et al., 2010).

1.1.1. Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase (**Abbildung 1**) setzt bei Verletzung des Endothels zunächst mit der reflektorischen Kontraktion der Blutgefäße ein. Dieser Vorgang wird als Vasokonstriktion bezeichnet. Dabei wird durch Lumenverkleinerung der Gefäße die Blutzufuhr reduziert (Michl, 2011).

Im nächsten Schritt beginnt der Prozess der Thrombozytenadhäsion. Zunächst wird subendotheliales Kollagen freigelegt. An das subendotheliale Kollagen gebundener Von-Willebrand-Faktor rekrutiert Thrombozyten über die Bindung an das Oberflächen-Glykoprotein(GP)-Ib/-IX/-V (Behrends et al., 2010).

Die Verbindung aus Kollagen-VWF- und Glykoproteinkomplex ist instabil. Das freigelegte subendotheliale Kollagen tritt für eine stabilere Adhäsion zusätzlich in Wechselwirkung mit GP-Ia/-IIa und GP-VI auf der Oberfläche der Thrombozyten. Die beständige Interaktion der Thrombozyten mit der subendothelialen Oberfläche wird durch Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise Integrin $\alpha 2\beta 1$ und Integrin $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$ sowie Fibronectin und Laminin ermöglicht (Freissmuth, Offermanns, 2012).

Nach der Thrombozytenadhäsion folgt zunächst die Aktivierung der Thrombozyten, die durch die Degranulation der Thrombozyten selbst ausgelöst wird. Diese setzen aus ihren Granula thrombozytenaktivierende Mediatoren wie beispielsweise Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A_2 , Thrombin und Serotonin frei, die weitere Thrombozyten aktivieren und rekrutieren (Michl, 2011). ADP wird in großen Mengen in den δ -Granula von Thrombozyten intrazellulär gespeichert. Nach

Freisetzung aktiviert ADP die G-Protein-gekoppelten purinergen Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂. Diese sind an der Thrombozytenaggregation beteiligt. Gleichzeitig wird Calcium, das ein wichtiger Kofaktor bei der Thrombozytenaktivierung ist, freigesetzt. Nach Erhöhung der Calcium-Konzentration wird die Arachidonsäure gebildet. Diese wird in den Thrombozyten schnellstens durch die Cyclooxygenase-1 und die Thromboxansynthase zu Thromboxan A₂ umgesetzt. Thromboxan A₂ aktiviert den Prostanoid-Rezeptor, der sich an weitere Guaninnucleotid-bindende(G)-Proteine bindet und fördert zusätzlich die Thrombozytenaggregation. Bei der Aktivierung weiterer Thrombozyten über die beiden G-Protein-gekoppelten proteaseaktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-4 spielt Thrombin ebenfalls eine wichtige Rolle (Freissmuth, Offermanns, 2012). Die Thrombozytenadhäsion und die Thrombozytenaktivierung führen zur morphologischen Veränderung der Thrombozyten und zur Ausbildung von Pseudopodien. Durch diese Formveränderung können die Thrombozyten effektiver aneinander haften. Zusätzlich wird ein Teil der negativ geladenen Phospholipide der Thrombozyten, die wichtig sind bei der Blutgerinnungskaskade, nach außen gerichtet. Auch kommt es zu einer Aktivierung des Glykoproteinrezeptors GP-IIb/-IIIa auf der Oberfläche der Thrombozyten. Der Glykoproteinrezeptor GP-IIb/-IIIa vernetzt durch die Bindung von Fibrinogen die Thrombozyten. Es kommt zur Thrombozytenaggregation, die bereits während der Aktivierung der Thrombozyten initiiert wurde. Dabei wird aus den α -Granula Thrombospondin ausgeschüttet. Thrombospondin sichert die Fibrinogenbrücken. Die Vernetzung wird dadurch irreversibel und es bildet sich ein primärer Thrombozytenpfropf (Behrends et al., 2010).

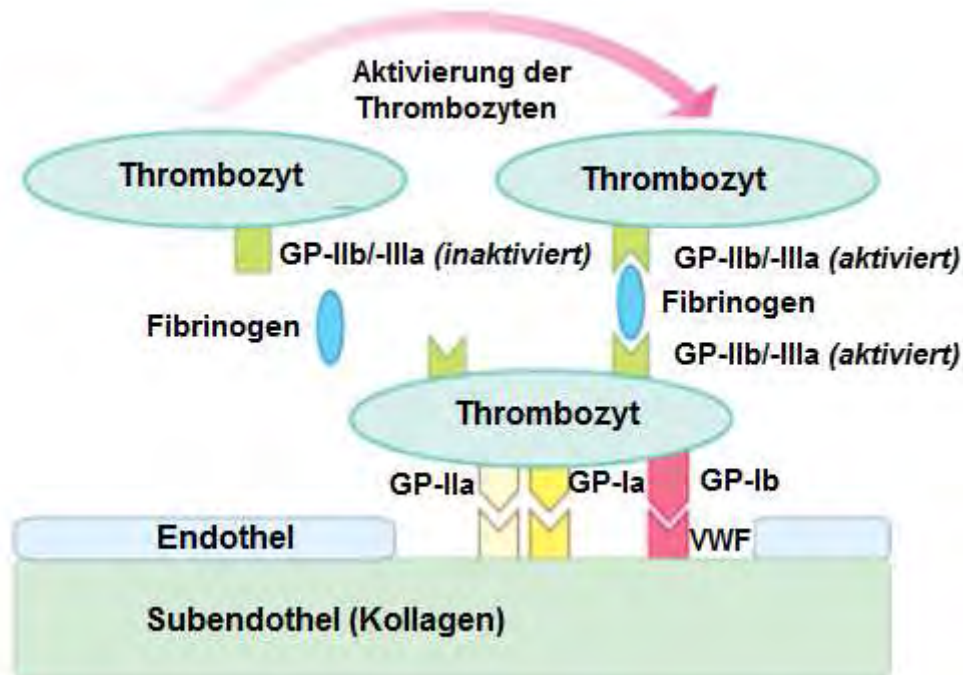


Abbildung 1: Thrombozytenadhäsion und -aggregation während der primären Hämostase. Bei Verletzung des Endothels wird subendotheliales Kollagen freigelegt, an das der VWF bindet. Die Thrombozytenadhäsion ist auch durch direkte Bindung von thrombozytärem GP-Ia und GP-IIa an das freigelegte Kollagen des Subendothels möglich. Dadurch kommt es zu einer stabileren Adhäsion. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch Mediatoren wird die Thrombozytenaggregation vermittelt. Durch Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den aktivierten GP-IIb/IIIa-Rezeptoren der Thrombozyten aggregieren die Thrombozyten und es bildet sich ein primärer Thrombozytenpfropf.
Quelle: Herdegen T. (2010): *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 2. Auflage. Kiel: Georg Thieme Verlag.

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt gleichzeitig mit der Thrombozytenaktivierung. Während der plasmatischen Gerinnung wird letztendlich ein Fasernetz aus Fibrin gebildet, in dem Thrombozyten und Erythrozyten eingelagert sind. Es kommt zu einem stabilen Verschluss des verletzten Endothels. Die Gerinnungskaskade unterteilt sich dabei in die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase (Behrends et al., 2010).

Die sekundäre Hämostase kann durch zwei Aktivierungswege mit gemeinsamer Endstrecke initiiert werden: Intrinsisch durch einen Endotheldefekt oder extrinsisch durch Kontakt des Plasmas mit dem Gewebefaktor III (Michl, 2011).

Die intrinsische Aktivierung der Gerinnungskaskade (**Abbildung 2**) wird *in vitro* durch den Kontakt des Hagemann-Faktors (XII) mit unphysiologischen, negativ geladenen Glasoberflächen und das Zusammenwirken des hochmolekularen Kininogens initiiert. Der Faktor XII wird zu XIIa aktiviert. Der Faktor XIIa aktiviert den Rosenthal-Faktor (XI) zu XIa, den Hämophilie-B-Faktor (IX) zu IXa und den Hämophilie-A-Faktor (VIII)

zu VIIIa. Die Aktivierung des Faktors XI zu XIa wird nicht nur durch den Faktor XIIa initiiert, sondern auch durch einen in der Thrombozytenmembran lokalisierten Thrombozytenfaktor. Die Faktoren IXa und VIIIa bilden mit Calciumionen und Phospholipiden einen Enzymkomplex. Dieser Enzymkomplex wird als Tenase bezeichnet und führt zur Aktivierung des Stuart-Prower-Faktors (X) zu Xa. Die Aktivierung von Faktor X zu Xa bildet die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade mit dem extrinsischen System (Neumann, 2008).

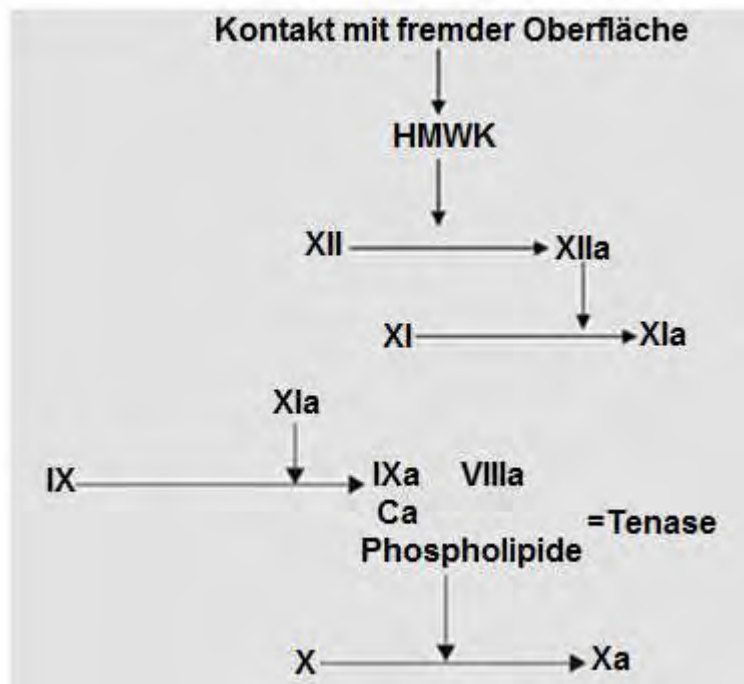


Abbildung 2: Intrinsisches System der sekundären Hämostase. Beim intrinsischen System werden Gerinnungsfaktoren durch den Kontakt mit einer fremden negativ geladenen Glasoberfläche aktiviert. Durch den hochmolekularen Kininogen-Faktor (*High-molecular-weight kininogen*, HMWK) wird der Faktor XII zu XIIa umgesetzt. Der Faktor XIIa aktiviert den Faktor XI zu XIa. Der Faktor XIa führt dazu, dass der Faktor IX zu IXa umgesetzt wird. Gleichzeitig wird der Faktor VIII von XIIa zu VIIIa aktiviert. In Anwesenheit von Calciumionen und Phospholipiden bilden die Faktoren IXa und VIIIa den Enzymkomplex Tenase. Die Tenase aktiviert den Faktor X zu Xa.

Quelle: Neumann H.A. (2008): *Das Gerinnungssystem*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade über den physiologischen extrinsischen Weg wird durch den Kontakt von ausströmendem Blut bei einem verletzten Gefäß mit dem Gewebefaktor (III) ausgelöst. Der Faktor III aktiviert Prokonvertin (VII) zu VIIa (Michl, 2011).

Wie bereits erwähnt, erreichen das intrinsische und das extrinsische System (**Abbildung 3**) eine gemeinsame Endstrecke, nämlich die Aktivierung des Faktors X zu Faktor Xa. Der Faktor Xa bildet mit dem aktiven Proaccelerin (Va) sowie Calciumionen und Phospholipiden einen gemeinsamen Enzymkomplex. Dieser Enzymkomplex wird als Prothrombinase bezeichnet. In der Aktivierungsphase

wandelt die Prothrombinase das Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa) um. Das Thrombin setzt im nächsten Schritt in der Koagulationsphase das Fibrinogen (I) zu Fibrin um und aktiviert gleichzeitig den fibrinstabilisierenden Faktor (XIII) zu XIIIa. Zusätzlich wirkt Thrombin autokatalytisch und verstärkt seine Wirkung durch Aktivierung des Faktors V und des Faktors VIII. Bei der Aktivierung von Fibrinogen werden Fibrinpeptide abgespalten, die Fibrinmonomere ausbilden. Die Fibrinmonomere vernetzen sich und bilden zunächst lösliche Polymere aus. In der Retraktionsphase werden die löslichen Polymere durch den Faktor XIIIa zu unlöslichen Polymeren stabilisiert (Neumann, 2008). Es bildet sich ein beständiges, unlösliches Thrombozyten-Fibrinnetz. Dieses beständige Gerinnsel schließt Erythrozyten ein und wird daher als roter Thrombus bezeichnet (Michl, 2011).

Das plasmatische Gerinnungssystem ist einer ständigen Kontrolle durch physiologische Gerinnungsinhibitoren ausgesetzt. Beispiele für Gerinnungsinhibitoren sind der *tissue factor pathway inhibitor* (tFPI) sowie Antithrombin III (ATIII), Protein C und Protein S. Der Gerinnungsinhibitor tFPI ist für die lokale Beschränkung der Thrombinwirkung auf den Ort der Verletzung, durch Hemmung der Faktoren VIIa und Xa, verantwortlich. Antithrombin III inhibiert die Wirkung von Thrombin durch proteolytischen Abbau. Zusätzlich werden weitere Gerinnungsfaktoren wie beispielsweise Serinproteasen von ATIII inaktiviert. Die Wirkung der Proteine C und S ist vom Vitamin K abhängig. Das Protein C inaktiviert die Faktoren V und VIII und begünstigt das Auflösen der Fibringerinnsel. Das Protein S ist für die Funktion von Protein C unerlässlich und übernimmt die Rolle des Kofaktors (Michl, 2011).

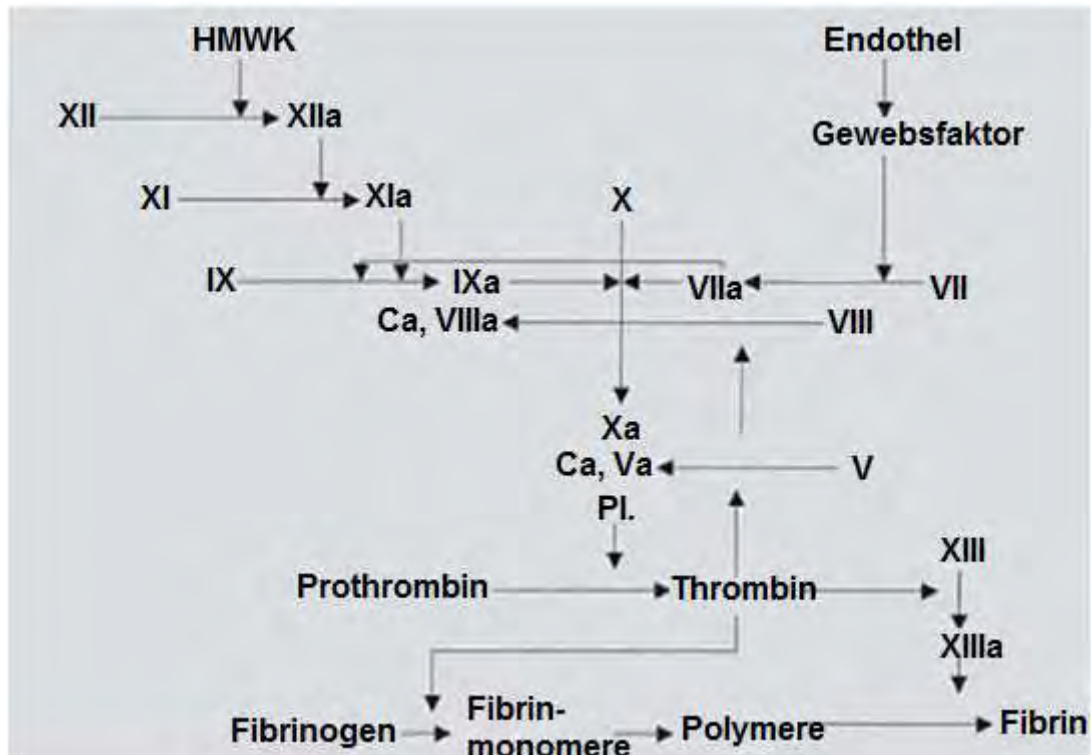


Abbildung 3: Intrinsisches und extrinsisches System der sekundären Hämostase. Das intrinsische System ist bereits in Abbildung 2 beschrieben worden und ist hier zur Vollständigkeit der Veranschaulichung der sekundären Hämostase aufgeführt. Bei einem verletzten Endothel wird der Faktor III aktiviert. Dieser aktiviert wiederum den Faktor VII zu VIIa. Der Faktor VIIa setzt zusammen mit dem Enzymkomplex Tenase des intrinsischen Systems den Faktor X zu Xa um. Der Faktor Xa bildet zusammen mit Calciumionen, Phospholipiden und dem aktivierten Faktor Va den Enzymkomplex Prothrombinase (PI). Die Prothrombinase wandelt das Prothrombin in Thrombin um. Thrombin hat mehrere Aktivierungsaufgaben zu erledigen: Es setzt Fibrinogen zu Fibrin um und aktiviert XIII zu XIIIa sowie V zu Va und VIII zu VIIIa. Die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen wird durch den Faktor XIIIa stabilisiert.

Quelle: Neumann H.A. (2008): *Das Gerinnungssystem*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.

1.1.3. Fibrinolyse

Die Fibrinolyse beschreibt einen enzymatischen Auflösungsprozess von Fibringerinnseln zur Verhinderung von Thrombosen und Embolien. Dabei werden die Gefäße nach Wundheilung für den Blutstrom wieder geöffnet. Die Fibrinolyse wird entweder intrinsisch durch Aktivatoren der Gefäßwand oder extrinsisch durch Aktivatoren aus dem Gewebe initiiert (Michl, 2011).

Bei der intrinsischen Aktivierung der Fibrinolyse sind der Faktor XIIa und das Kallikrein-Kininogen-System von wichtiger Bedeutung. Der Faktor XIIa wandelt das Kininogen zum Bradykinin um. Bradykinin führt zur Ausschüttung des *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) aus dem Gefäßendothel. Dadurch wird Plasminogen zu Plasmin umgewandelt. Diese Umsetzung wird zusätzlich durch den Faktor XIIa verstärkt, der auch Plasmakallikrein aktiviert (Michl, 2011).

Bei der extrinsischen Aktivierung der Fibrinolyse werden aus dem Gewebe Plasminogenaktivatoren freigesetzt. Zur Gruppe der Plasminogenaktivatoren gehören t-PA und die Urokinase, die auch als urinärer Plasminogenaktivator (u-PA) bezeichnet wird. Plasminogenaktivatoren wandeln das Plasminogen in das aktive Enzym Plasmin um. Plasmin ist eine Serinprotease, die die Faktoren V, VIII, Fibrinogen und Fibrin spaltet (**Abbildung 4**). Es kommt zur Auflösung von Fibrinthromben. Die Spaltprodukte von Fibrin inhibieren die Aktivierung von Thrombozyten und wirken der Gerinnungsbildung entgegen. Das bereits entstandene Gerinnsel wird abgebaut (Michl, 2011).

Die Fibrinolyse wird durch die Inhibitoren α_2 -Antiplasmin und den Plasminogen-Inhibitor-Aktivator (PAI) reguliert. Durch Bindung von α_2 -Antiplasmin wird die Wirkung von Plasmin gehemmt. Die Wirkung von t-PA und u-PA wird von PAI inhibiert (Michl, 2011).

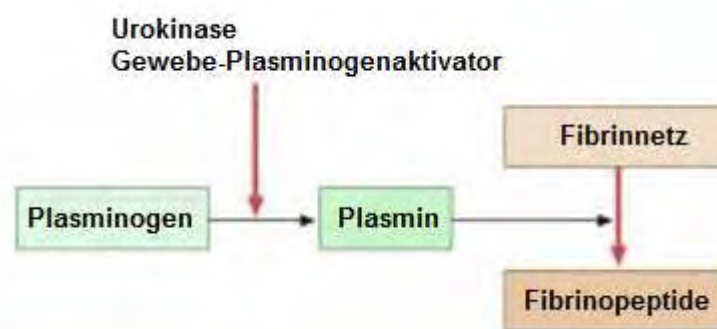


Abbildung 4: Fibrinolyse. Bei der Fibrinolyse werden Fibringerinnsel enzymatisch aufgelöst. Durch den Gewebe-Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA) und die Urokinase wird Plasminogen zu Plasmin umgesetzt. Durch aktiviertes Plasmin wird das Fibrinnetz aufgelöst und es entstehen Fibrinopeptide.

Quelle: Behrends J.C., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S., Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., Wischmeyer E. (2010): *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

1.2. Der Von-Willebrand-Faktor

Der Von-Willebrand-Faktor ist ein adhäsives, multimeres Glykoprotein. Das Gen des VWFs liegt auf dem Chromosom 12p13 (Bruhn et al., 2011). Die biologische Halbwertszeit des VWF im Plasma liegt bei sechs bis zwölf Stunden (Bundesärztekammer, 2009).

Der Von-Willebrand-Faktor erfüllt zwei wichtige Funktionen in der primären Hämostase: Zum einen wird durch Anheftung des VWFs an die GP-Ib- und GP-IIb/IIIa-Rezeptoren der Thrombozyten die Plättchenaggregation der Hämostase aktiviert und zum anderen wird durch den VWF die Thrombozytenadhäsion an die Kollagenfibrillen des Subendothels am verletzten Gefäß ermöglicht (Neumann,

2008). Zusätzlich schützt plasmatischer VWF den Faktor VIII vor dem Abbau (Weiss, Sussmann, Hoyer, 1977).

Der VWF besitzt strukturelle und funktionelle Domänen (**Abbildung 5**). Am N-terminalen Ende befindet sich das Propeptid mit 714 Aminosäuren. Das Propetid setzt sich aus der D1- und D2-Domäne zusammen. Die Disulfidisomerasen in der D1- und D2-Domäne besitzen beide die Aminosäuresequenz Cystein-Glycin-Leucin-Cystein (CGLC). Zwischen dem Propetid und der D'-Domäne befindet sich die proteolytische Schnittstelle für Furin. Die D'-Domäne weist eine Bindungsstelle für den Faktor VIII auf. In der D3-Domäne liegt die Multimerisierungsregion, die ebenfalls eine CGLC-Sequenz besitzt. Hier entstehen Disulfidbrückenbindungen zwischen den Dimeren (Schneppenheim, 2004). In der A1-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für GP-Ib α und Kollagen. Die proteolytische Schnittstelle Tyr1605-Met1606 für die Protease ADAMTS13 ist in der A2-Domäne zu finden. Eine weitere Kollagenbindungsstelle befindet sich in der A3-Domäne. Funktionelle Eigenschaften der C-terminalen Sequenzen D4-B1-3-C1-2 sind nicht vollständig bekannt. Die D4-Domäne, die wichtig für die Interaktion mit ADAMTS13 ist, besitzt zwar die gleiche CGLC-Sequenz wie die D1-, D2- und D3-Domäne, jedoch hat diese keine Auswirkungen auf die Multimerisierung. Bei hohem Scherstress sind die C1- und C2-Domänen an der Bindung von VWF an Fibrin beteiligt. Die C1-Domäne weist eine Arginin-, Glycin- und Asparaginsäure-Sequenz (RGD-Sequenz) für die GP-IIb/GP-IIIa-Bindung auf. In der *cystein-knot-like domain* (CK-Domäne) findet die Dimerisierung statt (Schneppenheim, Budde, 2011).

2012 wurde eine verfeinerte Domänenstruktur für VWF eingeführt, die die einzelnen D-Domänen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten weiter definiert (**Abbildung 6**). Dabei werden die D-Domänen des VWFs in VWD1-4, Cystein 8-1-4 (C8-1-4), *trypsin-inhibitor-like1-4* (TIL1-4) und das E-1-3-Segment unterteilt (Zhou et al., 2012).

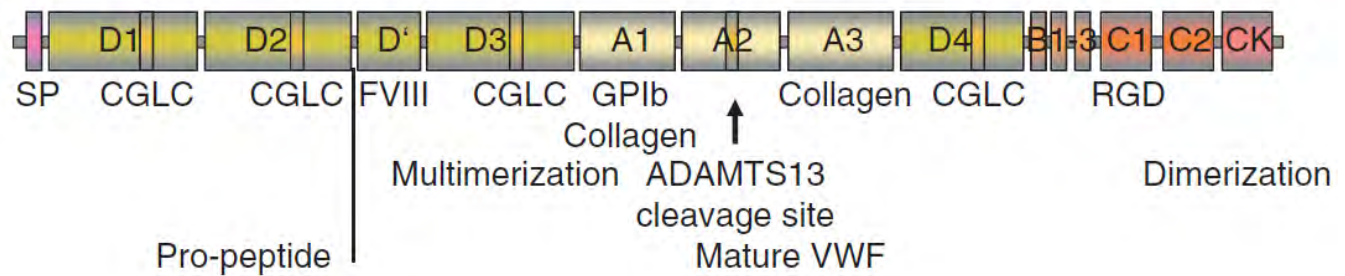


Abbildung 5: Die strukturellen und funktionellen Domänen des VWFs. Nach Synthese in den Endothelzellen und Megakaryozyten besitzt VWF 2813 Aminosäuren. Am N-terminalen Ende befindet sich das Signalpeptid (SP), das sich aus 22 Aminosäuren zusammensetzt. Das Propeptid umfasst 714 Aminosäuren und besteht aus den D1- und D2-Domänen. Die proteolytische Schnittstelle für Furin befindet sich zwischen dem Propetid und der D'-Domäne. Die D'-Domäne weist eine Bindungsstelle für den Faktor VIII auf. Die Multimerisierungsregion liegt in der D3-Domäne. In der A1-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für GPIIb und Kollagen. In der A2-Domäne ist die proteolytische Schnittstelle Tyr1605-Met1606 für ADAMTS13 lokalisiert. In der A3-Domäne befindet sich eine weitere Kollagenbindungsstelle. Die D4-Domäne und die D1-, D2- und D3-Domäne weisen eine CGLC-Sequenz auf. Die funktionellen Eigenschaften der C-terminalen Sequenzen D4-B1-3-C1-2 sind nicht vollständig bekannt. Die D4-Domäne ist an der Interaktion mit ADAMTS13 beteiligt und besitzt eine CGLC-Sequenz. Die C1- und C2-Domäne spielen bei hohem Scherstress eine wichtige Rolle für die Bindung von VWF an Fibrin. In der C1-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für die Glykoproteine GP-IIb-/GP-IIIa. In der CK-Domäne sind die Cysteinreste zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen VWF-Monomeren zur Bildung von VWF-Dimeren lokalisiert.

Quelle: Schneppenheim R., Budde U. (2011): *von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein*. In: J Thromb Haemost 2011; 9 (Suppl. 1): 209–215.

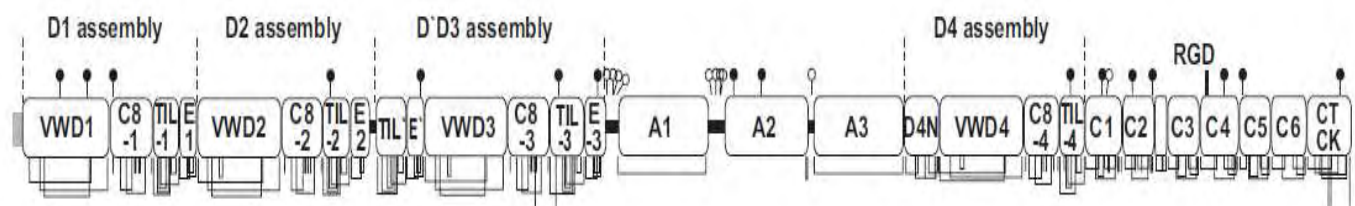


Abbildung 6: Verfeinerte VWF-Domänenstruktur. Die Disulfidbindungen der Cysteine sind die vertikalen Linien. N- und O-Glykane werden durch sogenannte offene und geschlossene „Lollipop“ dargestellt. Die D-Domänen des VWFs werden in VWD1-4, C8-1-4, TIL1-4 und das E-1-3-Segment unterteilt. Das E-Segment befindet sich lediglich in der D1-, D2-, D3- und D'-Domäne nach der TIL-Domäne und besteht aus vier bis sechs Cysteinen. Die D4-Domäne besitzt kein E-Segment, weist dagegen aber zwischen der A3- und VWD4-Domäne das Segment D4N bestehend aus acht Cysteinen auf, welches durch eine Disulfidbindung an VWD4 gebunden ist. Die Segmente C8-1 und C8-2 besitzen zehn Cysteine, während die Segmente C8-3 und C8-4 zehn bis elf Cysteine aufweisen. Die C1-, C3- und C5-Domäne besitzen die gleiche homologe Sequenz zueinander. Die C2-, C4- und C6-Domäne zeigen im Vergleich zu der C1-, C3- und C5-Domäne eine ähnliche Länge und Sequenz auf.

Quelle: Zhou Y.-F., Eng E.T., Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. (2012): *Sequence and structure relationships within von Willebrand factor*. In: BLOOD, 12 JULY 2012_VOLUME 120, NUMBER 2.

Die Biosynthese des VWFs erfolgt in den Endothelzellen und Megakaryozyten (**Abbildung 7**). Das Prä-Pro-Monomer des VWFs weist ein Molekulargewicht von 360 Kilodalton (kDa) auf und besteht aus 2813 Aminosäuren. Durch die Polymerisierung zu Multimeren erreicht der VWF ein Molekulargewicht zwischen 500 bis 20.000 kDa (Neumann, 2008).

Das Prä-Pro-Monomer des VWFs wird zunächst glykolysiert, sulfatiert und im endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Dimer verknüpft (Schneppenheim et al., 2001). Jedes Prä-Pro-Monomer wird an zwölf Glycanseitenketten N-glykosyliert und zehn Glykanseitenketten O-glykolysiert (Crawley et al., 2011). Die N-Glykolysierung des Glycans, das an die Aminosäure Asparagin an der Position 1574 in der A2-Domäne des VWFs gebunden ist, festigt die korrekte Faltung der A2-Domäne (McKinnon et al., 2008). Die O-Glykolysierung findet an der A1-Domäne statt und sorgt für die Versteifung der angrenzenden Domänen des VWFs (Schulte am Esch et al., 2005). Die Dimerisierung findet im endoplasmatischen Retikulum durch Ausbildung von Disulfidbrücken am C-terminalen Ende zwischen den freien Cystein-Resten der CK-Domänen der Pro-Monomere des VWFs statt. Es entstehen Pro-VWF-Dimere. Die Multimerisierung der Pro-VWF-Dimere findet im Golgi- und Post-Golgi-Kompartiment statt. Es entstehen Pro-VWF-Multimere unterschiedlicher Größe durch Polymerisation an der Cystein-reichen D3-Domäne (Schneppenheim, Budde, 2011). Nach Multimerisierung spaltet das Protein Furin das VWF-Propeptid ab. Reife VWF-Multimere werden entweder in Weibel-Palade-Körperchen (WPK) oder in den α -Granula von Plättchen als *ultralarge*-VWF (UL-VWF) gespeichert oder konstitutiv ins Blutplasma freigesetzt (Wagner et al., 1991).

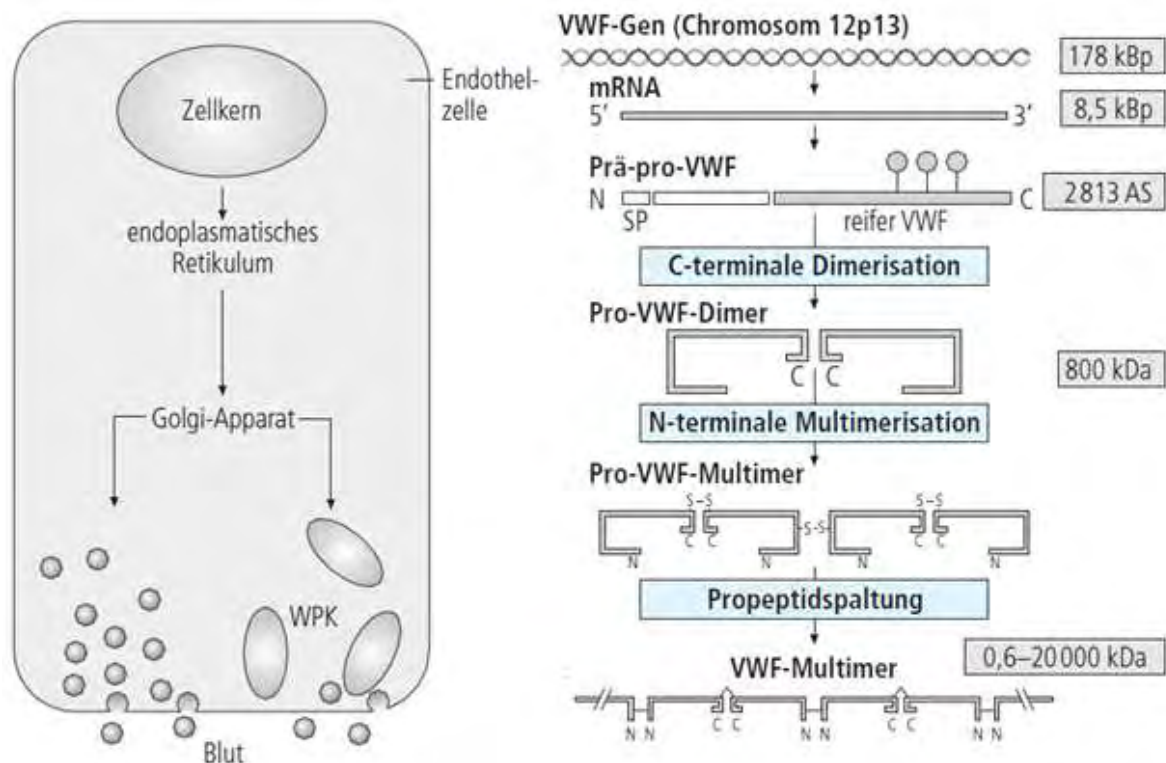


Abbildung 7: Biosynthese des VWFs. Das Gen für den VWF befindet sich auf dem Chromosom 12p13 und ist 178 Kilobasenpaare (kbp) groß und die *messenger ribonucleic acid* (mRNA) ist 8,5 kbp groß. VWF wird in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert. Das Prä-Pro-VWF-Monomer besitzt 2813 Aminosäuren. Es setzt sich aus dem Signalpeptid (SP), dem Propeptid und dem reifen VWF zusammen. Durch C-terminale Dimerisierung im endoplasmatischen Retikulum entsteht das Pro-VWF-Dimer. Das Pro-VWF-Dimer ist 800 kDa groß. Im Golgi-Apparat entsteht durch N-terminale Multimerisierung das Pro-VWF-Multimer. Nach Abspaltung des Propeptids durch Furin werden die VWF-Multimere entweder in den Weibel-Palade-Körperchen oder in den α -Granula von Plättchen gespeichert oder konstitutiv ins Blutplasma freigesetzt.

Quelle: Bruhn H.D., Hach-Wunderle V., Schambeck C.M., Scharf R.E. (2011): *Hämostaseologie für die Praxis*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH.

Im Blutplasma zirkuliert VWF als globuläres, multimeres Glykoprotein. Die Sekundärstruktur der A1-A2-A3-Domänen des VWFs ist wichtig für die Ausführung seiner Funktion während der primären Hämostase (Crawley et al., 2011). Dabei gilt, je länger die VWF-Multimere sind, desto höher ist die Aktivität von VWF während der primären Hämostase (O'Donnell et al., 2005).

Die Thrombozytenadhäsion wird nach Verletzung des Endothels durch den VWF vermittelt. Dabei nimmt VWF die Funktion als Bindeglied zwischen dem frei gelegten subendothelialen Kollagen und den Thrombozyten ein (Behrends et al., 2010). Durch die Kollagenbindungsstelle der A3-Domäne des VWFs bindet VWF an subendotheliales Kollagen (Schneppenheim, Budde, 2011). Die Adhäsion der Thrombozyten erfolgt durch die Bindung des VWFs an den GP-Ib-Rezeptor der Thrombozyten (Behrends et al., 2010). Dabei befindet sich die Bindungsstelle für GP-Ib in der A1-Domäne des VWFs und ist in globulärem Zustand nicht frei zugänglich.

(Crawley et al., 2011). Erst nach Verletzung des Endothels wird VWF durch Verankerung an Kollagen und den Scherfluss im Blutstrom gestreckt, wodurch die Bindungsdomäne für die Thrombozyten freigelegt wird. Die Bindung des VWFs an den GP-IIb/-IIIa-Rezeptor vermittelt die Thrombozytenaggregation (Behrends et al., 2010).

Die Größenregulierung von VWF-Multimeren erfolgt durch die Protease ADAMTS13 an der Position Tyr1605 und Met1606 in der A2-Domäne des VWFs. Diese proteolytische Schnittstelle ist für ADAMTS13, bedingt durch die Faltung der A2-Domäne, in globulärem UL-VWF nicht zugänglich. Die A2-Domäne besitzt prinzipiell den gleichen homologen Aufbau wie die A1- und A3-Domäne. Der A2-Domäne fehlt lediglich eine Disulfidbindung, die die N-terminalen Enden mit den C-terminalen Enden verbindet. Zusätzlich besitzt die A2-Domäne eine amphipathische α -Helix weniger als die A1- und A3-Domäne. In der A2-Domäne ist die α -Helix durch eine weniger geordnete Schleifenstruktur ersetzt. Diese Eigenschaften führen dazu, dass die A2-Domäne leichter entfaltet werden kann als die A1- und A3-Domäne. Auch weist die A2-Domäne an der Position Cys1669-Cys1670, lokalisiert am C-Terminus der letzten α -Helix in der A2-Domäne, eine vicinale Disulfidbindung auf. Diese Bindung führt dazu, dass das Peptidrückgrat eine unnatürlich angespannte Konformation annimmt. Die Disulfidbindung formt dabei einen acht-gliedrigen Ring, in dessen Inneren sich ein hydrophober Kern befindet. Bei genügend hohen Scherraten wird der hydrophobe Kern der A2-Domäne destabilisiert und es kommt zur Entfaltung der A2-Domäne (Zhang et al., 2009)¹. Nach Entfaltung der A2-Domäne kann ADAMTS13 durch proteolytischen Abbau die Aktivität des VWFs beeinflussen. Die A2-Domäne kann sich zurückfalten, wenn kein Scherstress mehr ausgeübt wird. Dabei wird die Zurückfaltung durch die Aminosäure cis-Prolin an der Position 1645 verzögert. Bei genügend hohen Scherraten erfolgt eine Isomerisierung von cis-Prolin zu trans-Prolin, die die Rückfaltung um 100 bis 1000 Sekunden retardiert (Zhang et al., 2009)².

1.3. ADAMTS13

ADAMTS13 ist ein 180 kDa großes Enzym, das zur Familie der Zink-abhängigen Metalloproteasen gehört (Crawley et al., 2011). ADAMTS-13 steht für *a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13* (George, 2008). Das

Enzym besitzt 1427 Aminosäuren und ist auf dem Chromosom 9q34 lokalisiert (Soejima et al., 2003). Die *complementary*-Desoxyribonukleinsäure (cDNS) ist 37 kBp groß (Tsai, 2007).

ADAMTS13, das die Größe des VWFs durch proteolytische Spaltung reguliert, wird hauptsächlich in Lebersternzellen (Uemura et al., 2005) und vaskulären Endothelzellen synthetisiert (Turner et al., 2006). Der Anteil an VWF beträgt 0,02 Prozent (%) der im Blutplasma zirkulierenden Proteine (Gao, Anderson, Sadler, 2008). UL-VWF kann sowohl direkt nach Sekretion aus den Weibel-Palade-Körperchen verankert an der Oberfläche der Endothelzellen als auch als freizirkulierender UL-VWF gespalten werden. Auch ist ein proteolytischer Abbau des entfalteten VWFs während der Plättchenaggregation möglich. Für die Spaltung des VWFs ist aber in jedem Fall die durch Scherfluss induzierte Entfaltung Voraussetzung (Crawley et al., 2011). VWF wird in seiner globulären Form nur von circa drei Prozent der Gesamtmenge an ADAMTS13 gebunden (Feys et al., 2009). Für die proteolytische Aktivität von ADAMTS13 sind die zweiwertigen Kationen Zink und Calcium im aktiven Zentrum erforderlich (Crawley et al., 2011). Dabei sind für die Bindung von Calcium die Aminosäuren Aspartat an der Position 182 und an der Position 187 sowie Glutamat an der Position 212 signifikant (Gardner et al., 2009).

ADAMTS13 besitzt verschiedene Domänen, die an der spezifischen Bindung von ADAMTS13 an ihr Substrat VWF beteiligt sind (**Abbildung 8**). Diese Protease ist in der Lage, die großen strukturellen Veränderungen, die durch Scherfluss innerhalb von VWF induziert werden, zu bewältigen. Dies zeigt, dass ADAMTS13 eine hohe Flexibilität aufweist und dass die Domänen von ADAMTS13 sehr variabel, und im Komplex agierend an der spezifischen Substratbindung beteiligt sind (Gao, Anderson, Sadler, 2008). Für eine vollständige proteolytische Aktivität ist das Zusammenwirken aller Domänen notwendig (Ai et al., 2005).

Am N-Terminus befindet sich zunächst die Metalloprotease-Domäne, die im aktiven Zentrum die drei konservierten Histidine His224, His228 und His234, sowie die Aminosäure Glu225 aufweist. Die Metalloprotease-Domäne erkennt die potenziell spaltbare Bindung Tyr1605-Met1606 des VWFs (Crawley et al., 2011). Mutationen der Aminosäuren an diesen Positionen reduzieren die Effizienz der Proteolyse durch ADAMTS13 erheblich (Pruss et al., 2008, Xiang et al., 2011).

Die Disintegrin-Domäne, die mit einer komplementären Struktur des VWFs interagiert und dafür sorgt, dass die Spaltstelle in der A2-Domäne des VWFs sich dem aktiven Zentrum von ADAMTS13 zuwendet, besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit der Cystein-reichen Domäne (Crawley et al., 2011). Mutationen von Arg349 oder Leu350 in der Disintegrin-Domäne können die Spaltungseffizienz um das 10 bis 20-fache reduzieren. Die Aminosäure Aspartat an der Position 1614 des VWFs führt zu einer Ladungswechselwirkung mit der Aminosäure Arginin an der Position 349 und sorgt für die richtige Orientierung der Spaltstelle der A2-Domäne (de Groot et al., 2009).

An die Disintegrin-Domäne schließt ein *first thrombospondin type-1* (TSP1)-Motiv an. Das TSP1-1-Motiv ist 48-54 Aminosäurereste groß und besitzt sechs Cysteine (Crawley et al., 2011).

Anschließend folgt die Cystein-reiche Domäne, die zehn konservierte Cysteine besitzt. An die Cystein-reiche Domäne grenzt die Spacer-Domäne an. Die Spacer-Domäne bildet zwei antiparallele β -Faltblattstrukturen (Crawley et al., 2011). Sie bindet an die C-terminale α -Helix der A2-Domäne des VWFs. Das TSP1-1-Motiv, die Cystein-reiche Domäne und die Spacer-Domäne interagieren mit der Region Gln1624-Arg1668 der A2-Domäne des VWFs. Diese Wechselwirkung erhöht die Bindungsspezifität um das 300-fache. Dabei bindet die Cystein-reiche Domäne zusammen mit der Metalloprotease-Domäne an die Aminosäuren Ile1642-Arg1659 der A2-Domäne des VWFs. Das TSP1-1-Motiv bindet an Gln1624-Val1630, während die Spacer-Domäne in Wechselwirkung mit den Aminosäuren Glu1660-Arg1668 der A2-Domäne des VWFs tritt. Die Aminosäuren Aspartat an der Position 1653 und Arginin an der Position 1659 der A2-Domäne des VWFs werden sowohl von der Cystein-reichen Domäne als auch von der Spacer-Domäne gleichzeitig gebunden. Die Bindungen an diesen Bereich begünstigen die Spaltung der Bindung Tyr1605-Met1606 des VWFs (Kokame et al., 2004). Der Bereich Gly1631-Arg1641 ist für die spezifische Bindung nicht relevant (Gao, Anderson, Sadler, 2008). Arg659 (Jin, Skipwith, Zheng, 2010) und Arg660, sowie die Tyrosinreste Tyr661 und Tyr665 der Spacer-Domäne von ADAMTS13 sind an der Interaktion mit der A2-Domäne des VWFs beteiligt (Pos et al., 2010).

An die Spacer-Domäne schließen sich die TSP1-2 bis TSP1-8-Regionen an (Crawley et al., 2011). Die TSP1-2-8-Wiederholungen am C-Terminus sowie die CUB-Domänen sind essentiell für eine effektive proteolytische Spaltung von Plättchen-dekorierten VWF-Multimeren durch ADAMTS13 unter Flussbedingungen (Zhang et

al., 2007). Zusätzlich kooperieren diese Domänen mit der Spacer-Domäne und führen zu einer effektiven Interaktion der Spacer-Domäne mit der A2-Domäne des VWFs (Crawley et al., 2011).

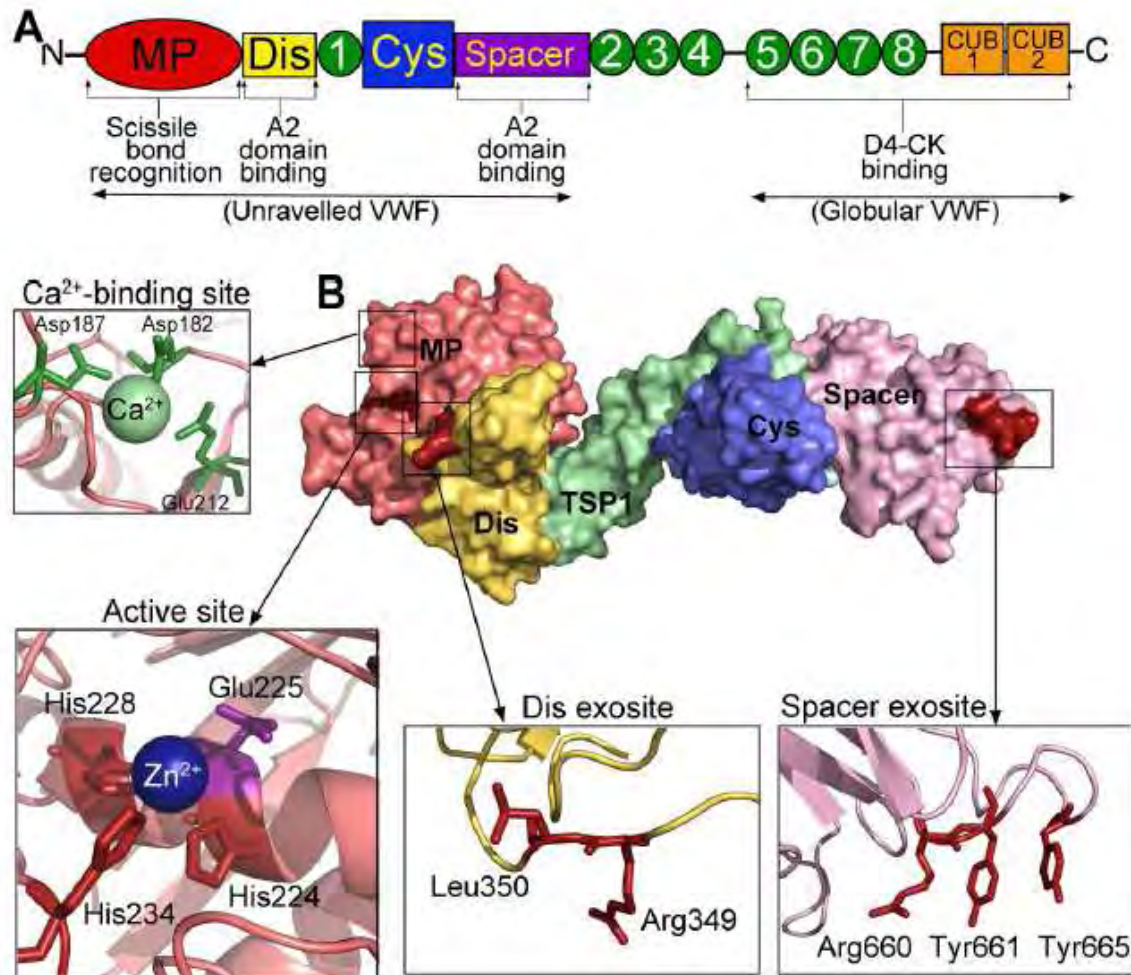


Abbildung 8: Domänen der Protease ADAMTS13. A: ADAMTS13 besitzt die Metalloprotease-Domäne (MP), die Disintegrin-Domäne (Dis), die TSP1-Regionen 1 bis 8 (1-8), die Cystein-reiche Domäne (Cys), die Spacer-Domäne und die CUB-Domänen. Die MP-Domäne erkennt die Spaltstelle des VWFs, die Dis-Domäne sowie die Spacer-Domäne binden an den VWF. Die TSP1-5-8-Regionen und die CUB-Domänen treten mit der D4-C-Region des globulären VWFs in Wechselwirkung. B: Struktur der einzelnen Domänen am N-Terminus von ADAMTS13 basierend auf der Kristallstruktur und Homologie-Analysen. Wichtige Aminosäuren sind in den Stäbchendarstellung in den Vergrößerungen gezeigt. Das Fenster links oben zeigt die Calciumbindungsstelle. Das Calciumion wird durch die Aminosäuren Asp187, Asp182 und Glu 212 koordiniert. Im aktiven Zentrum (links unten) koordinieren die Aminosäuren His224, His228, His234 und Glu225 das Zinkion. Die Disintegrin-Domäne besitzt die Aminosäuren Leu350 und Arg349, die in Wechselwirkung mit der A2-Domäne des VWFs treten. Die Spacer-Domäne weist die Aminosäuren Arg660, Tyr661 und Tyr665 auf, die ebenfalls an die A2-Domäne des VWFs binden können.

Quelle: Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: *Blood*, 118: 3212-3221.

Der grundlegende Mechanismus der proteolytischen Spaltung von VWF durch ADAMTS13 kann in mehreren Schritten erklärt werden (**Abbildung 9.1. bis Abbildung 9.3.**). VWF zirkuliert im Blut als multimeres, globuläres Protein. Dabei ist

die A2-Domäne im Inneren des Moleküls lokalisiert und für ADAMTS13 nicht freigelegt. Lediglich im Bereich der D4- und C-Domänen des VWFs sind Bindungsstellen für die Interaktion mit ADAMTS13 zugänglich (**Abbildung 9.1. A-B**). Durch die TSP1-5-8-Domänen und die CUB-Domänen kann ADAMTS13 an die D4- und C-Domänen des VWFs binden (**Abbildung 9.1. C**). Unter Scherstress im Blutfluss kann es zu einer teilweisen Entfaltung des VWFs kommen. Aber vor allem wird VWF gestreckt, wenn er am verletzten Endothel verankert, unter Scherfluss Fäden bildet (**Abbildung 9.1. D**). Aufgrund der Entfaltung werden die potenzielle Schnittstelle in der A2-Domäne und weitere Bindungsstellen für ADAMTS13 freigelegt. Die Spacer-Domäne erkennt die Aminosäuren Glu1660-Arg1668 in der A2-Domäne des VWFs und bindet an diesen Bereich (**Abbildung 9.2. E**). Im nächsten Schritt findet eine Wechselwirkung der Aminosäure Arg349 der Disintegrin-Domäne und der Aminosäure Asp1614 des VWFs statt (**Abbildung 9.2. F**). Durch weitere Wechselwirkung der Aminosäuren Leu198, Leu232 und Leu274 von ADAMTS13 und den Aminosäuren Leu1603 und Val1604 des VWFs wird die Spaltstelle Tyr1605-Met1606 des VWFs in Richtung des aktiven Zentrums von ADAMTS13 orientiert (**Abbildung 9.2. G**). Durch das Zusammenwirken verschiedener Sequenzen am N-terminalen Ende und der Aminosäuren Leu151, Val195 und Asp252-Pro256 von ADAMTS13 findet die proteolytische Spaltung der Bindung zwischen Tyr1605 und Met1606 des VWFs durch die Metalloprotease-Domäne von ADAMTS13 statt (**Abbildung 9.2. H**) (Crawley et al., 2011).

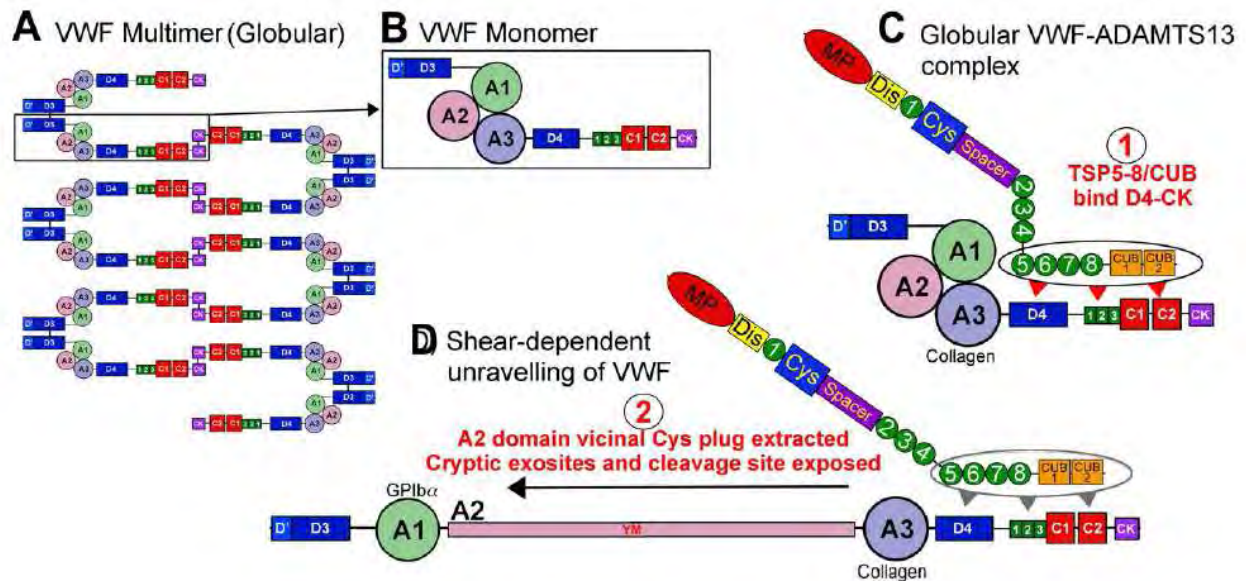


Abbildung 9.1: Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13. A: Im Blut zirkuliert VWF als multimeres, globuläres Protein. B: Das Multimer setzt sich aus Monomeren zusammen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In der globulären Konformation ist die Proteaseschnittstelle in der A2-Domäne verdeckt, aber die Kollagenbindungsstelle in der A3-Domäne ist zugänglich. C: Die TSP1-5-8-Domänen und CUB-Domänen von ADAMTS13 treten in Wechselwirkung mit dem VWF (Schritt 1). D: Im Scherfluss entfaltet sich der VWF durch den Einfluss von Scherkräften und die Bindungsstellen der A2-Domäne werden freigelegt (Schritt 2).

Quelle: Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: Blood, 118: 3212-3221.

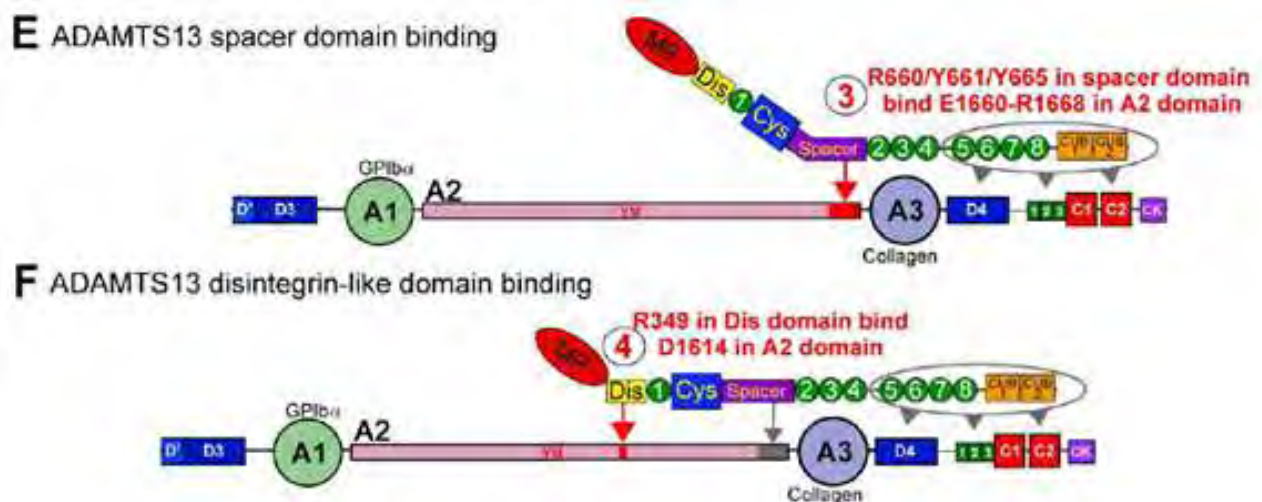
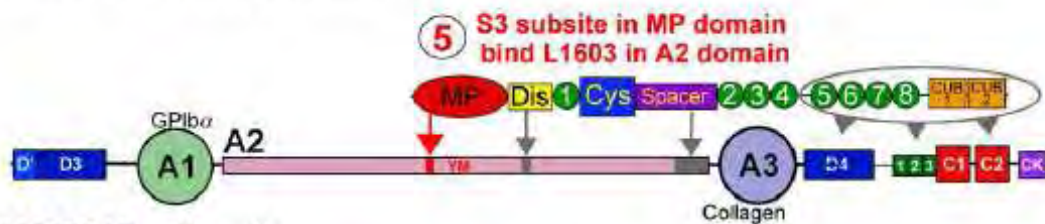


Abbildung 9.2: Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13. E: Die Aminosäuren Arg660, Tyr661, und Tyr665 in der Spacer-Domäne von ADAMTS13 binden an Glu1660 und Arg1668 der A2-Domäne des VWFs (Schritt 3). F: Im nächsten Schritt interagiert die Aminosäure Arg349 in der Disintegrin-Domäne von ADAMTS13 mit der Aminosäure Asp1614 in der A2-Domäne des VWFs (Schritt 4). Dies führt zur Ausrichtung der Metalloprotease-Domäne in Richtung der Schnittstelle des VWFs.

Quelle: Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: Blood, 118: 3212-3221.

G ADAMTS13 metalloprotease domain binding



H ADAMTS13 active site binding to cleavage site

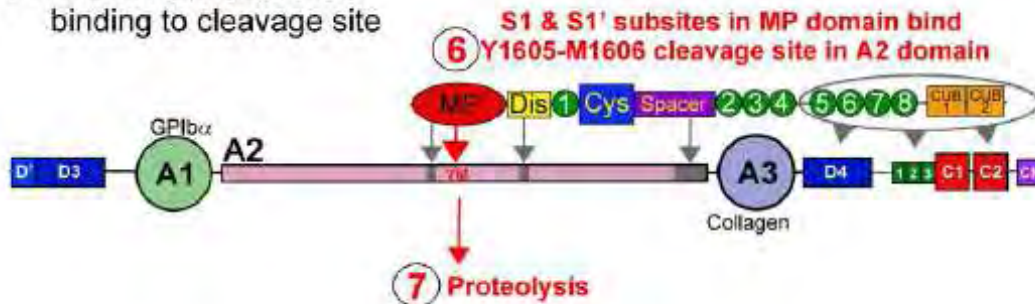


Abbildung 9.3: Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13. G: Die N-terminale Sequenz (S3) zusammengesetzt aus den Aminosäuren Leu198, Leu232 und Leu274 in der Metalloprotease-Domäne (MP) bindet Leu1603 in der A2-Domäne des VWFs (Schritt 5). H: Die N-terminalen Sequenzen S1 und S1' in der Metalloprotease-Domäne von ADAMTS13 binden an Tyr1605 und Met1606 (Schritt 6). Der VWF wird an dieser Position in der A2-Domäne proteolysiert (Schritt 7).

Quelle: Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: *Blood*, 118: 3212-3221.

1.4. Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura ist eine lebensbedrohliche mikroangiopathische Erkrankung, die sich durch die Symptome hämolytische Anämie, einen Mangel an Thrombozyten, Fieber, renale Schäden und neurologische Fehlfunktionen, wie beispielsweise Bewusstseinstörung, Koma, epileptische Anfälle und Schlaganfälle kennzeichnet (Pötzsch, Madlener, 2002). Bei einigen Patienten treten asymptomatische Schübe von Thrombozytopenie und Anämie bis zum lebensbedrohlichen Organversagen auf (Schneppenheim et al., 2003). Rezidivierende Episoden von TTP führen bei 30 % der Patienten zu zerebralen vaskulären Komplikationen. Diese Rezidive verursachen neurologische Ausfälle. Auch krankhafte renale Symptome führen bei 20 % der Patienten zu einem völligen Nierenversagen im Endstadium (Loirat et al., 2006). Die Inzidenz für TTP liegt geschätzt bei zwei bis zehn Fällen auf eine Million Menschen pro Jahr über alle ethnischen Gruppen verteilt (Galbusera, Noris, Remuzzi, 2009).

In TTP-Patienten liegt eine ADAMTS13-Aktivität von weniger als 0,1 units per milliliter (U/ml) vor (Levy et al., 2001, Tsai, Lian, 1998, Furlan et al., 1998). Bei TTP-

Patienten entstehen hyperadhäsive ultralange (UL)-VWF-Multimere, die zur vermehrten systematischen Thrombozytenaggregation in Abwesenheit eines Endothelschadens führen. Durch die reduzierte Aktivität von ADAMTS13 werden UL-VWF-Multimere nach Sekretion und während der Zirkulation im Plasma nicht geschnitten. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten unter Ausbildung von Thromben in kleinsten Arteriolen und Kapillaren. Bei unbehandelter TTP liegt die Mortalitätsrate bei 85 bis 90 % (Mueller-Eckhardt, Kiefel, 2004).

TTP existiert in zwei Formen: Es wird zwischen der hereditären (USS) und erworbenen Form der TTP unterschieden. Die erworbene Form der TTP tritt eher im Erwachsenenalter auf, während die hereditäre Form der TTP in der neonatalen Periode und im Kindesalter häufig rezidivierend auftritt (Fujimura et al., 2002). Die hereditäre Form der TTP wird durch Mutationen im ADAMTS13-Gen ausgelöst. Die erworbene TTP entsteht durch Autoimmunglobuline gegen ADAMTS13 (Hassenpflug et al., 2004). Bei beiden Arten der TTP sind die Symptome dieselben. An dem Ausbruch von TTP sind Kofaktoren wie Schwangerschaft (Wiznitzer et al., 1992, Noris et al., 2005, Peyvandi et al., 2006), Entzündungen, Traumata (Shibagaki et al., 2006), Krebs, Drogen, Infektionen, Sepsis und Transplantationen (Moake, 2002) beteiligt.

Bis zu 70 bis 80 % der TTP-Patienten leiden an der erworbenen Form der TTP (Ruggenti, Noris, Remuzzi, 2001). Bei Patienten mit erworbener TTP sind hauptsächlich die Immunglobuline der Klasse G für die Inhibition von ADAMTS13 verantwortlich (Tsai, Lian, 1998, Furlan et al., 1998). Auch die Immunglobuline A und M können an der Inhibition beteiligt sein (Ferrari et al., 2007). Immunglobuline reagieren vorwiegend gegen die Cystein-reiche Domäne und die Spacer-Domäne von ADAMTS13. Bei Kombination mehrerer verschiedener Immunglobuline werden auch die Propeptid-Regionen, die Metalloprotease-Domäne, die Disintegrin-Domäne, die TSP1-1-8-Regionen und die CUB-Domänen angegriffen (Soejima et al., 2003, Klaus et al., 2004). Die Bildung von Immunglobulinen gegen ADAMTS13 kann beispielsweise durch Infektionen mit Mykoplasmen oder dem Epstein-Barr-Virus verursacht werden (Tsai, 2003)¹.

Die hereditäre Form von TTP wird auch als Upshaw-Schulman-Syndrom bezeichnet und wird autosomal rezessiv vererbt (Levy et al., 2001). Sie kann direkt nach der

Geburt, in der Kindheit oder erst im Erwachsenenalter ausbrechen (Furlan, Lämmle, 2001, Wiznitzer et al., 1992, Uchida et al., 2004). Der Zeitpunkt des Ausbruchs ist abhängig von der Art und dem Ort der Genmutation (Galbusera, Noris, Remuzzi, 2009). Beispielsweise führen Mutationen in der TSP1-6- und TSP1-7-Region von ADAMTS13 zu einem späteren Ausbruch der Krankheit und einer milderer Form der hereditären TTP (Meyer et al., 2008, Palla et al., 2009). Bei der hereditären Form von TTP wurden bisher einzelne oder wiederkehrende Episoden von Thrombozytopenie, mikroangiopathische hämolytische Anämien und Thrombosen festgestellt, die zum multiplen Organversagen führen können (George, 2006). Die verminderte Aktivität von ADAMTS13 bei der hereditären Form von TTP kann durch eine fehlerbehaftete Synthese von ADAMTS13, eine beeinträchtigte Zellsekretion, den Verlust oder die Verringerung der proteolytischen Aktivität oder durch eine gesteigerte Degradation von ADAMTS13 während der Zirkulation bedingt sein (Manea et al., 2007). Bei der hereditären Form von TTP sind mehr als 80 Mutationen des ADAMTS13-Gens bekannt. Von diesen 80 bereits bekannten Mutationen sind 60 % *Missense*-Mutationen, während die restlichen Mutationen *Nonsense*-Mutationen, Deletionen oder Insertionen sind. *Nonsense*-Mutationen, Deletionen und Insertionen verursachen *Frameshifts* oder Trunktionen. Die meisten TTP-Patienten weisen heterozygote Mutationen auf. Lediglich 15 % der Patienten mit hereditärer TTP besitzen homozygote Mutationen (Galbusera, Noris, Remuzzi, 2009). Mutationen der N-terminalen Domänen von ADAMTS13 führen zu einem schwereren Grad der Krankheit und vor allem zu einem früheren Ausbruch von TTP als Mutationen der C-terminalen Domänen (Lotta et al., 2012).

TTP-Patienten können mit Plasmaintfusion oder Plasmaaustausch behandelt werden (Bukowski, 1982). Die Aktivität von ADAMTS13 in TTP-Patienten liegt unter fünf Prozent der Aktivität im Normalplasma (Bianchi et al., 2002). Nach Behandlung überleben 60 bis 90 % die Krankheit (Rock et al., 1991). Die Behandlung von erworbener TTP ist komplexer als die Behandlung von hereditärer TTP. Bei der erworbenen TTP ist sowohl Plasmaaustausch als auch Immunsuppression notwendig. Patienten mit erworbener TTP benötigen eine große Menge frischen Plasmas, die durch Plasmaaustausch ermöglicht wird. Einige Patienten leiden an rezidivierenden Krankheitsepisoden und müssen über einen längeren Zeitraum mit Plasmaaustausch behandelt werden. Zusätzlich werden solchen Patienten

beispielsweise Thrombozytenaggregationshemmer, Zytostatika wie Vincristin und Cyclophosphamid sowie das Immunsuppressivum Azathioprin verabreicht. Der Effekt ist von Patient zu Patient variabel. Vielversprechende Ergebnisse und Remission der Krankheit wurden bisher mit dem chimären monoklonalen Antikörper Rituximab gegen das Oberflächenantigen CD20 erreicht (Tsai, 2003)¹.

Patienten mit hereditärer TTP können nur mit dem Austausch von ADAMTS13 behandelt werden (Furlan et al., 1999). Die Patienten benötigen hierbei 10 bis 15 Milliliter pro Kilogramm (ml/kg) frisches Plasma (Tsai, 2003)¹. Die Halbwertszeit von ADAMTS13 beträgt zwei bis drei Tage. Da fünf Prozent Aktivität zur Vermeidung von Symptomen ausreichen, ist ein Plasmaaustausch alle zwei bis drei Wochen notwendig (Furlan et al., 1999). Das Austauschen von Plasma ist teurer als Plasmainfusionen und birgt potenzielle Komplikationen wie beispielsweise Infektionen (Tsai, 2003)¹.

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Von-Willebrand-Faktor spezifische Protease ADAMTS13 besitzt verschiedene Domänen, die teils scherunabhängig, teils scherabhängig die Bindung an VWF vermitteln. Mutationen im ADAMTS13-Gen rufen die hereditäre Form der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura hervor und führen zu einer Reduktion der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13. Aktuelle diagnostische Tests quantifizieren die proteolytische Aktivität solcher ADAMTS13-Mutanten unter denaturierenden, statischen Bedingungen und können daher nicht zwischen scherabhängigen und scherunabhängigen Defekten unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst ADAMTS13-Mutanten, die in Patienten mit hereditärer TTP (USS) gefunden wurden, rekombinant hergestellt werden. Anschließend sollten diese Mutanten unter nativen Scherflussbedingungen auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht werden. Es wurden die folgenden *Missense*-Mutationen ausgewählt, da sie jeweils in unterschiedlichen Domänen lokalisiert sind: Asp235Tyr, Cys400Arg, Pro671Leu, Pro353Leu, Gly702Arg, Arg1219Trp und Gly1239Val. Abschließend sollte evaluiert werden, ob der Flussassay geeignet ist, um scherbedingte Fehlfunktionen von ADAMTS13 zu diagnostizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte. Angabe des Modells bzw. der Seriennummer und des Herstellers.

Gerät	Modell/Seriennummer	Hersteller
Brutschrank	69466	Shel lab
Clean Bench	49243	Holten Camin Air
Feinwaage	57582	Scaltex
Fluoreszenzmikroskop BZ9000	1016322	Keyence
Ibidi Perfusion Set	0396	Ibidi
Ibidi Pump System 2.0	P0196	Ibidi
Inkubation System for Microscopy	INUG2E-K13	Tokai HIT
Inkubator	055219	Heraeus
Kühlschrank	303432	Liebherr
Kodak Imager	-	Kodak
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	06071	Consort
pH-Meter	05876	Knick
Pipetus classic	65148	Hirschmann Laborgeräte
Pipette 0,2 – 2 µl	GA52573	Gilson
Pipette 1 – 10 µl	GE20840	Gilson
Pipette 20 – 100 µl	U575291	Gilson
Pipette 100 – 1000 µl	GE23777	Gilson
Schüttler, 4°C	50154	Rocky
Schüttler	27129	Heidolph
Thermostat	05882	Eppendorf
Vortex Mixer	60725	Heidolph
Waage	05878	Scaltex
Zentrifuge	60724	Eppendorf

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. Angabe der Katalognummer und des Herstellers.

Verbrauchsmaterialien	Katalognummer	Hersteller
μ -Slide ^{0,41µm}	13022516	Ibidi
Blotmodul	-	Invitrogen
Centrifugal Filter Units	R2DA98923	Millipore
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml	3028001	Eppendorf
Hybond-P PVDF Transfermembran	RC2538	Amersham Life Science
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel	NP0322BOX	Novex by life technologies
Petrischale	H07	Sarstedt
Pipette 5 ml	2164E	Sarstedt
Pipette 10 ml	2319E	Sarstedt
Pipette 25 ml	2216K	Sarstedt
Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl Bioshere Filter Tips	3050901	Sarstedt
Pipettenspitzen 2 – 100 µl Bioshere Filter Tips	3051101	Sarstedt
Pipettenspitzen 100 – 1250 µl Bioshere Filter Tips	V22946	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15 ml, 120x17 mm	3040401	Sarstedt
Reaktionsgefäße 50 ml, 114x28 mm	3040601	Sarstedt
Sponge Pad	E190952	Invitrogen
XcellSureLock	110801-0221	Invitrogen
Zellkulturflasche 75 cm ²	2338036	Sarstedt
Zellkulturflasche 175 cm ²	3057082	Sarstedt

2.1.3. Chemikalien

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien. Angabe der Katalognummer und des Herstellers.

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
BSA	03780765	Sigma
Calciumchlorid	1133055	Merck
Glucose	90710L	Delta Select GmbH
Hepes	079K5410	Sigma
Histamin	H7125-16	Sigma Life Science
Kaliumchlorid	1049361000	Merck
Magermilchpulver	60219	Naturaflor

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
Magnesiumchlorid	8059300100	Merck
Methanol	8049	J. T. Baker
Natriumchlorid	0278	J.T. Baker
Natriumdihydrogenphosphat	A791986	Merck
Natriumhydrogencarbonat	K1138725	Merck
Paraformaldehyd 20%	121213	Electron Microscopy Sciences
Triton X 100	37240	Berg
Trizma base	090115414	Sigma
Tween-20	9005-64-5	Sigma Aldrich

2.1.4. Verwendete Lösungen und Medien

Tab. 4: Liste der verwendeten Lösungen/Medien. Angabe des Herstellers und der Katalognummer, bei selbsthergestellten Lösungen Angabe der Zusammensetzung.

Lösung/Medium	Katalognummer	Hersteller/Zusammensetzung
0,5 M Schwefelsäure	-	49,08 g Schwefelsäure 1 L H ₂ O
0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	1176850	Gibco by life technologies
Antibiotic/Antimycate Solution 100x	P002123826	PAA
DPBS (1x)	1222353	Gibco by life technologies
DMEM (1x) + GlutaMax ⁻¹	1252127	Gibco by life technologies
Endothelial Cell Growth Medium 2	3010802	PromoCell
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	9469655	GE Healthcare Life Sciences
Full Range Rainbow TM MW Marker	908735	GE Healthcare Life Sciences
HiMark TM Pre-Stained HMW Protein Standard	1239695	Invitrogen
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA Testpuffer	130530	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA Detection Antibody	130515	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA Enzyme Conjugate	R14923	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA Substrate TMB	0522C520	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA ADAMTS13 Standard 100 ng/ml	130514	Sekisui Diagnostics, LLC

Lösung/Medium	Katalognummer	Hersteller/Zusammensetzung
IMUBIND® ADAMTS13-ELISA Positive Control 24,0+/-3,6 ng/ml	130425	Sekisui Diagnostics, LLC
Innovance VWF Ac	OPM103	Siemens
Lipofectamine 2000 Reagent	1234318	Invitrogen
MES SDS Running Buffer (20x)	1295019	Novex by life technologies
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	NF172917	Thermo Scientific
NuPage LDS-Sample Buffer (4x)	1338492	Novex by life technologies
Opti-MEM (1x) + GlutaMax ⁻¹	1204396	Gibco by life technologies
OptiPro TM SFM	1145603	Gibco by life technologies
Transfer Buffer 20x Stock Solution	1162769	Novex by life technologies
TBS 10x Stock Solution	-	80 g NaCl 30 g Tris-Base 1 L H ₂ O pH 7,4
TBS 1x	-	100 ml 10xStock TBS 900 ml H ₂ O
TTBS 1x	-	100 ml 10xStock TBS 500 µl Tween 900 ml H ₂ O
1 % BSA	-	500 µl BSA 49,5 ml 1x PBS
50 µM Histamin	.	0,0566 g Histamin 1 ml H ₂ O
4 % Paraformaldehyd	-	10 ml 20% Paraformaldehyd 40 ml PBS
0,3 % Triton	-	0,15 ml Triton X-100 49,85 ml 1x PBS
HBRs	-	140 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM Glucose 10 mM Hepes pH 7,4
5 % Milchpuffer	-	2,5 g Milcheiweiß 50 ml 1x TBS
2,5 % Milchpuffer	-	1,25 g Milcheiweiß 50 ml 1x TTBS

2.1.5 Verwendete Vektoren

Tab. 5: Die verwendeten Vektoren. Angabe der Konzentration.

Vektor	DNS-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
pcDNA 3.1. Neo VCP D235Y	2,5
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 G1239V	1,3
pcDNA 3.1. Neo (+) C400R	1,8
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 P671L	2,0
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 G702R	2,2
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 R1219W	1,6
pcDNA 3.1. Neo (+) VCP P353L	1,9
pcDNA 3.1. Neo VCP WT	2,7

2.1.6 Verwendete Antikörper

Tab. 6: Die verwendeten Antikörper. Angabe der Lotnummer und des Herstellers.

Antikörper	Lotnummer	Hersteller
Goat anti-mouse Alexa Fluor 546 linked	1107499	Invitrogen
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 linked	1024116	Invitrogen
Mouse anti-rabbit, HRP linked	E0387	Dako
Rabbit anti-goat, HRP linked	00082099	Dako
Rabbit Polyclonal anti-ADAMTS13	C0504	Santa Cruz
Rabbit Polyclonal anti-VWF	00068077	Dako
Ziege anti-ADAMTS13	WK644	Bethyl

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung

2.2.1.1. Auftauen eukaryotischer Zellen

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC-Zellen, PromoCell) der Passage 3 werden bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. HUVEC-Zellen sind primäre Zellen, die aus einer humanen Nabelschnur isoliert werden (Marin et al., 2001). Zur Kultivierung müssen diese zunächst aufgetaut werden. Das Auftauen der Zellen in den Kryoröhrchen erfolgt bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad. Nach dem Auftauen wird unter der Sterilsicherheitswerkbank gearbeitet. Die Zellen werden in 10 ml Medium überführt. Dabei richtet sich die Wahl des Mediums nach der Wahl der entsprechenden Zellen. *Human embryonic kidney-293-Epstein-Barr virus nuclear antigen* (HEK-293-EBNA)-Zellen werden in *Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium* (DMEM, Gibco by life technologies) und HUVEC-Zellen werden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (PromoCell) überführt. Die Zellen werden auf- und abpipettiert und das Kryoröhrchen wird mit dem gewählten Medium nachgespült. Im nächsten Schritt wird für 5 min bei 930 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wird in 10 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wird in eine 75 cm^2 Kulturfalsche überführt. Diese Kulturflasche wird mit 15 ml Medium gefüllt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank gelagert. Nach 48 h wird das Medium durch vorsichtiges Abgießen entfernt und durch 30 ml frisches Medium ersetzt. Je nach Vitalität und Adhärenz der Zellen werden diese entweder nach 72 h oder nach 96 h passagiert.

2.2.1.2. Passagieren eukaryotischer Zellen

2.2.1.2.1. HEK-293-EBNA-Zellen

HEK-293-EBNA-Zellen sind effizient transiente Expressionssysteme. HEK-293 ist eine humane Zelllinie. Sie ist aus einer Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen und DNS-Fragmenten des Adenovirus 5 entstanden. HEK-293-EBNA-Zellen exprimieren das Antigen des Epstein-Barr-Virus (EBV) (Wurm, Bernard, 1999).

Unter der Sterilsicherheitswerkbank werden HEK-293-EBNA-Zellen bei Erreichen der Maximaldichte in einer 175 cm² Kulturflasche passagiert. Die Konfluenz liegt hierbei bei 90 bis 100 %.

Das Medium wird zu Beginn des Passagierens vorsichtig verworfen. Die Zellen werden zunächst mit 10 ml *phosphate buffered saline* (PBS) zur Entfernung ungebundener Bestandteile gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 2,5 ml Trypsin behandelt. Durch Abklopfen werden die Zellen in Suspension gebracht. Anschließend wird mit DMEM (Gibco by life technologies) auf 10 ml Volumen aufgefüllt und mehrfach auf- und abpipettiert. Von der Suspension werden 1,5 ml in eine neue 175 cm² Kulturfalsche überführt. Diese Kulturflasche wird mit 30 ml Medium (DMEM mit 10 % fötales bovines Serum und 1 % Penicillin-Streptavidin, Gibco by life technologies) gefüllt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.1.2.2. HUVEC-Zellen

HUVEC-Zellen werden bei Erreichen der Maximaldichte innerhalb von 2 bis 3 Tagen in einer 75 cm² Kulturflasche unter der Sterilsicherheitswerkbank passagiert. Die Konfluenz liegt hierbei bei 90 bis 100 %. Das Medium wird zu Beginn vorsichtig verworfen. Die Zellen werden mit 10 ml PBS zur Entfernung ungebundener Bestandteile gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 3 ml Trypsin kurz gespült. Anschließend werden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin für 1 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Abklopfen werden die Zellen in Suspension gebracht. Mit Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell) wird auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt. Von der Suspension wird 1 ml in eine neue 75 cm² Kulturfalsche überführt. Diese Kulturflasche wird mit 30 ml Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell) gefüllt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 2 bis 3 Tagen ist erneutes Passagieren möglich. Da es sich bei HUVEC-Zellen um primäre Zellen handelt, ist das Passagieren nur bis zur Passage 10 sinnvoll. Danach verändern sich Viabilität und Expressionsmuster und es muss ein frisches Aliquot der Zellen aufgetaut werden.

2.2.1.3. Kultivierung unter Flussbedingungen

HUVEC-Zellen werden wie unter 2.2.1.2. beschrieben passagiert. Von der Suspension wird 1 ml in eine neue 75 cm² Kulturfalsche überführt. Der restliche Anteil wird zur Kultivierung in μ -Slides^{0,4 luer} (Ibidi) verwendet. Es werden 2 ml auf 4 Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellsuspension wird jeweils auf ein Volumen von 1,5 ml mit Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell) aufgefüllt. Im nächsten Schritt wird für 2 min bei 270 rcf bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 1 ml Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell) resuspendiert. Die Suspension wird anschließend mit Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell) verdünnt (1:2). In jedes μ -Slide^{0,4 luer} (Ibidi) werden zunächst 150 μ l Suspension pipettiert. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ für 1 bis 2 h inkubiert. Nach Inkubation werden die Zellen wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben an das blue-Perfusion Set (Ibidi, Länge: 15 cm, Innerer Durchmesser: 0,8 mm) eines Pumpsystems (Ibidi) angeschlossen. In den Reservoirs des Perfusion Sets befinden sich 10 ml Endothelial Cell Growth Medium 2 (Promocell). Das Perfusion Set wird mit den μ -Slide^{0,4 luer} (Ibidi) in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gestellt. Nach Starten der Pumpe werden die Zellen bei einem Scherstress von 5 dyn/cm² kultiviert.

2.2.2. Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen

Die Transfektion wird mit eukaryotischen Expressionsvektoren, die die cDNS für die folgenden ADAMTS13-Mutationen enthalten, durchgeführt: Asp235Tyr, Cys400Arg, Pro671Leu, Gly702Arg, Arg1219Trp, Gly1239Val und Pro353Leu. Zusätzlich wird Wildtyp (wt) ADAMTS13 untersucht.

Die Transfektion der HEK-293-EBNA-Zellen erfolgt in 175 cm² Kulturflaschen. Jeder Transfektionsansatz wird in 50 ml Röhrchen angesetzt. Es werden pro Ansatz 1,8 ml Opti-MEM (Gibco by life technologies), 100 μ l Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) und 27 μ g DNS benötigt. Die Zugabe von Lipofectamine 2000 Reagent muss vorsichtig erfolgen. Lipofectamine 2000 Reagent darf nicht geschüttelt werden und die Berührung mit dem 50 ml Röhrchen muss vermieden werden, da das Reagenz sonst am Plastik haftet. Der Transfektionsansatz wird leicht geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor die DNS der Mutanten und des Wildtyps zugegeben wird, muss diese gut durchmischt werden. In **Tabelle 7** ist eine Auflistung der zugegebenen Menge jedes Vektors zu sehen. Der

Transfektionsansatz wird geschwenkt und für 30 bis 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium in den Kulturflaschen wird vorsichtig verworfen und durch 30 ml frisches DMEM inkl. 10% FBS (Gibco by life technologies) ersetzt. Der Transfektionsansatz wird in das frische Medium pipettiert. Die Kulturflasche wird bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 24 h inkubiert.

Nach 24 h Inkubation wird das Medium vorsichtig verworfen und durch 30 ml serumfreies Medium (FreeStyle™ 293 Expression Medium, Invitrogen oder OptiPro™ Serum Free Medium, Gibco by life technologies) ersetzt. Die Zellen werden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Tab. 7: Eingesetztes Volumen jedes Vektors. Für die Transfektion werden die Mutanten p.Asp235Tyr, p.Cys400Arg, p.Pro671Leu, p.Gly702Arg, p.Arg1219Trp, p.Gly1239Val und p.Pro353Leu und der Wildtyp wtADAMTS13 verwendet. Das für die Transfektion benötigte Volumen ergibt sich als Divident aus der für die Transfektion geforderten DNS-Menge von 27 µg und eingesetzter DNS-Konzentration.

Vektor	Transfektionsvolumen [µl]
pcDNA 3.1. Neo VCP D235Y	10,8
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 G1239V	20,8
pcDNA 3.1. Neo (+) C400R	15,0
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 P671L	13,5
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 G702R	12,3
pcDNA 3.1. Neo ADAMTS13 R1219W	16,9
pcDNA 3.1. Neo (+) VCP P353L	14,2
pcDNA 3.1. Neo VCP WT	10,0

2.2.3. Lyse der transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen

Transfizierte HEK-293-EBNA-Zellen werden mit 10 ml PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wird das PBS entfernt. Es wird 1 ml M-PER Mammalian Protein Reagent (Pierce) (inkl. 1x Proteaseinhibitor Mix (Roche)) auf die Zellen gegeben. Im Kühlraum wird die Kulturflasche mit den Zellen für 10 min geschwenkt. Es folgt das Abschaben mit einem Drigalski-Spatel. Das Zelllysat wird in 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 12 min bei 8 °C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand wird bei -20 °C für weitere Zwecke eingefroren oder sofort verwendet.

2.2.4. Konzentrierung von Mediumproteinen transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen

Der Überstand der transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen wird in 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wird verworfen und der Überstand wird mithilfe von Konzentrierungseinheiten, den Centrifugal Filter Units (Millipore) mit einem Größenausschluss von 100 kDa, 20-fach konzentriert. Die Konzentrierung erfolgt bei 4000 rpm und 4 °C. Das Konzentrat wird in 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt und erneut bei 1400 rpm für 2 min bei 8 °C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand wird bei -20 °C für weitere Zwecke eingefroren.

2.2.5. Western Blot

Im Western Blot werden die Lysate und Konzentrate der transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen untersucht. Es werden 10 µl Lysat, 20 µl steriles Wasser und 10 µl LDS-Probenpuffer (Novex by life technologies) in einem Eppendorfer Reaktionsgefäß zusammengegeben. Gleichzeitig werden 5 µl Konzentrat, 25 µl steriles Wasser und 10 µl LDS-Probenpuffer in einem Eppendorfer Reaktionsgefäß vorbereitet. Alle Proben werden im Heizblock bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Als Marker wird Full Range Rainbow™ (GE Healthcare Life Sciences) oder HiMark™ (Invitrogen) verwendet. Von den aufgekochten Proben werden je 20 µl und von dem Marker 10 µl in die Taschen eines 4 bis 12 %-igen NuPage-Gels (Novex by life technologies) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt in 1x Runningpuffer (Novex by life technologies) für 1,5 h bei 180 V.

Im nächsten Schritt wird die Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 1 min in 100 % Methanol auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgt die Lagerung in Transferpuffer mit 10 % Methanol. Für einen Western Blot werden neben der PVDF-Membran vier Schwämme und zwei Filterpapiere benötigt. Die Schwämme und die Filterpapiere werden vor Benutzung in Transferpuffer mit 10 % Methanol eingetaucht. Ins Blotmodul des XCellSureLock-Systems (Invitrogen) werden nacheinander zwei Schwämme, ein Filterpapier, das zugeschnittene Gel, die PVDF-Membran, ein Filterpapier und zwei Schwämme gelegt. Das Blotmodul wird in das XCellSureLock-Gehäuse fest eingespannt. Der innere Bereich des XCellSureLock-Gehäuses wird mit Transferpuffer mit 10 % Methanol aufgefüllt. Der äußere Bereich des XCellSureLock-Gehäuses wird bis zu $\frac{3}{4}$

mit Wasser aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgt bei 30 V für 1 h. Danach wird die PVDF-Membran für mindestens 20 min in 5 % Milchpulver in TTBS (*Tris-Buffered Saline* (TBS) mit 0,05 % Tween-20) auf dem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wird die PVDF-Membran in einem 15 ml Falcon-Tube mit dem Primärantikörper Z797 (Ziege Anti-ADAMTS13, 1:1000, Bethyl) in 2,5 % Milchpulver in TTBS über Nacht bei 8 °C auf dem Schüttler inkubiert. Der primäre Antikörper ist gegen das zu untersuchende Protein gerichtet.

Am darauf folgenden Tag wird die Membran 3x in 50 ml 2,5 % Milchpulver in TTBS für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wird die Membran für mindestens 1 h auf dem Schüttler mit dem zweiten Antikörper rabbit anti-goat-HRP (1:2500, Dako) inkubiert. Der sekundäre Antikörper lagert sich an den konstanten Teil des primären Antikörpers an und bindet diesen. Danach wird 3x mit 50 ml TTBS für jeweils 10 min gewaschen. Mit dem ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Life Sciences) wird nach Anleitung des Herstellers die Membran entwickelt. Mit dem Programm Kodak Mi im Kodak Image Station Imager wird die Membran fotografiert und kann folglich ausgewertet werden.

2.2.6. ADAMTS13-ELISA

Der ELISA zur Bestimmung der ADAMTS13 Konzentration erfolgt mit dem IMUBIND® ADAMTS13 ELISA Kit (Sekisui Diagnostics, LLC) nach Anleitung des Herstellers: Zu Beginn der Durchführung werden die Proben mit Testpuffer verdünnt (1:20, Sekisui Diagnostics). Je 100 µl der verdünnten Proben werden in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird mit einer Azetat-Abdeckfolie bedeckt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wird 4x mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween-20, pH 7,4) gewaschen. Im nächsten Schritt werden 100 µl des Detektionsantikörpers in die Vertiefungen pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Azetat-Abdeckfolie bedeckt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wird 4x mit Waschpuffer gewaschen. Danach werden 100 µl des Enzym-Konjugats in die Vertiefungen pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Azetat-Abdeckfolie bedeckt und bei RT für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird 4x mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettiert, mit einer Azetat-Abdeckfolie bedeckt und bei RT für 5 min inkubiert. Im letzten Schritt werden 50 µl 0,5 M

Schwefelsäure in die Vertiefungen pipettiert. Die Messung der ADAMTS13-Konzentrationen erfolgt im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.2.7. Mikrofluidischer Assay

Im Versuch wird der mikrofluidische Assay mit dem green/yellow-Perfusion Set (Ibidi) durchgeführt. Es wird mit einem Scherstress von 5 dyn/cm^2 , einem Druck von 10 mbar, einer Fließrate von 3,8 ml/min und einer Scherrate von 500 s^{-1} gearbeitet.

Die Vorbereitung des Perfusion Sets wird unter der Sterilsicherheitswerkbank durchgeführt. In zwei Reservoirs befindet sich Pufferlösung. Es wird mit 10 ml *Hepes buffered ringer solution* (HBRS)-Pufferlösung (140 mM Natriumchlorid (NaCl), 5 mM Kaliumchlorid (KCl), 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2), 1 mM Calciumchlorid (CaCl_2), 10 mM HEPES, pH = 7,4) gearbeitet. Diese Pufferlösung wird vor Benutzung bei 37°C für 15 min inkubiert. Zur Pufferlösung wird Histamin in einer Endkonzentration von $150 \mu\text{M}$ hinzugegeben. Zusätzlich wird zur Pufferlösung ein Komplex aus Reagenz I und Reagenz III des Innovance VWF Ac Kit (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) hinzugegeben. Reagenz I besteht aus Latexkügelchen, an die ein monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper aus der Maus gekoppelt ist. Reagenz III besteht aus einem rekombinanten GP-Ib α -Peptid, das zwei *gain-of-function*-Mutationen aufweist. Reagenz III und Reagenz I werden im Verhältnis 1:4 für 1 h bei 4°C unter Schwenken vor Benutzung inkubiert. Es werden $200 \mu\text{l}$ der entstandenen GP-Ib α -Kügelchen in die Pufferlösung gegeben.

An das Perfusion Set wird luftblasenfrei ein μ -Slide^{0,4 luer} (Ibidi) angeschlossen. In diesem Slide befinden sich vitale HUVEC-Zellen, die unter Fluss für 24 bis 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert wurden (siehe 2.2.1.3.). Bevor der Versuch gestartet werden kann, muss das Perfusion Set in dem Inkubator (37°C , 5 % CO_2) platziert werden. Anschließend wird das μ -Slide in die dafür speziell eingebaute Inkubationskammer (Tokai-Hit, 5 % CO_2 , 37°C) eines Fluoreszenzmikroskops (BZ-9000, Keyence) eingesetzt. Die HUVEC-Zellen werden mit einer 40-fachen Vergrößerung im Durchlichtkanal beobachtet. Nach Bildung der Fäden von VWF-Multimeren wird das Konzentrat der wtADAMTS13 oder der ADAMTS13-Mutanten in die Pufferlösung gegeben. Das Konzentrat wird vor Verwendung bei 37°C für 15 min inkubiert. Es wird die Zeit gemessen, die notwendig für den Abbau der VWF-Fäden durch ADAMTS13 ist. Nach 60 min wird der Versuch gestoppt.

2.2.8. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz werden die Zellen nach VWF-Fädenbildung fixiert. Hierfür wird ein drittes Reservoir an dem green/yellow-Perfusion Set (Ibidi) befestigt. Im dritten Reservoir befinden sich 8 ml 4 % Paraformaldehyd. Nach 60 min werden die Zellen für 10 min bei 5 dyn/cm² fixiert.

Im Folgenden werden die fixierten Zellen 3x mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wird mit 0,5 ml 0,3 % Triton für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ permeabilisiert. Das Triton wird aus dem µ-Slide^{0,4 luer} (Ibidi) entfernt. Es wird 3x mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Blockierung unerwünschter Bindungen werden die Zellen mit 0,5 ml 1 % BSA behandelt. Es wird für mindestens 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im nächsten Schritt wird das BSA abgenommen. Es erfolgt die Inkubation mit dem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako). Die Zellen werden für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Inkubation wird 3x mit 1 ml PBS gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen mit sekundären Antikörpern für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Als sekundäre Antikörper wird der goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) zur Detektion des anti-VWF und der goat anti-mouse Alexa Fluor 546 (1:5000, Invitrogen) zur Detektion des mouse anti-GP-Ibα Antikörpers auf der Oberfläche der Latexkügelchen eingesetzt. Im letzten Schritt werden die Zellen 3x mit 1 ml PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop (BZ-9000, Keyence).

3. Ergebnisse

Im Rahmen der Thematik „Mikrofluidische Analyse von scherflussinduzierten Defiziten TTP-assoziiierter ADAMTS13-Mutanten“ wurde überprüft, inwiefern TTP-assoziierte Mutationen innerhalb verschiedener ADAMTS13-Domänen unter Flussbedingungen Einfluss auf die proteolytische Spaltung von VWF haben. Zunächst wurden ADAMTS13-Mutanten rekombinant hergestellt und mithilfe des Western-Blots und eines für ADAMTS13-spezifischen ELISA-Tests quantifiziert. Anschließend wurde der mikrofluidische Assay eingesetzt, der native Bedingungen simulierte. Hierbei wurden die ADAMTS13-Mutanten unter Scherfluss auf ihre proteolytische Aktivität in Abhängigkeit der Zeit getestet. Zusätzlich wurde die qualitative Bewertung des proteolytischen Abbaus der VWF-Fäden durch die Protease ADAMTS13 mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung realisiert.

3.1. Rekombinante Expression von wtADAMTS13 und ADAMTS13-Mutanten

Für die Analyse im mikrofluidischen Assay erfolgte zunächst die rekombinante Expression von wtADAMTS13 und ADAMTS13-Mutanten. Es wurden HEK-293-EBNA-Zellen als Expressionssystem gewählt (siehe 2.2.2.). Die Transfektion wurde mit eukaryotischen Expressionsvektoren, die die cDNS für wtADAMTS13 und die folgenden ADAMTS13-Mutanten enthalten, durchgeführt: p.Asp235Tyr, p.Cys400Arg, p.Pro671Leu, p.Gly702Arg, p.Arg1219Trp, p.Pro352Leu und p.Gly1239Val. Da ADAMTS13 ein Sekretionssignal enthält, wird das Protein von den HEK-293-EBNA-Zellen in das Medium FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen) oder in OptiPro™ Serum Free Medium (Gibco by life technologies) abgegeben. Nach 48-stündiger Expression (siehe 2.2.2.) wurden die Zellen lysiert (siehe 2.2.3.) und das ADAMTS13-Protein enthaltene Medium 20-fach konzentriert (siehe 2.2.4.).

Die Analyse der Expression und der Sekretion der ADAMTS13-Proteine erfolgte im Western Blot (**Abbildung 10-11**). Die Detektion wurde mit dem Primärantikörper gegen humanes ADAMTS13 aus der Ziege (Z797,1:1000, Bethyl) und dem Sekundärantikörper rabbit anti-goat-HRP (1:2500, Dako) durchgeführt (siehe 2.2.5.).

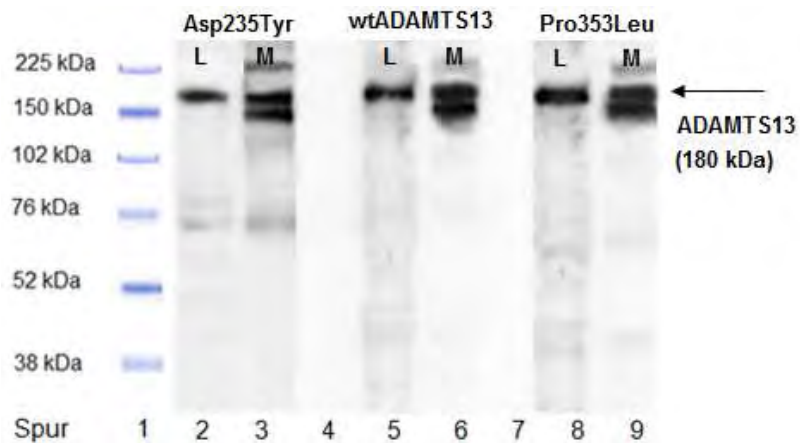


Abbildung 10: Nachweis von rekombinanten ADAMTS13-Varianten mittels Western Blotting.

Nach 48-stündiger Expression von wtADAMTS13 bzw. der ADAMTS13-Mutanten p.Asp235Tyr und p.Pro353Leu wurde das ADAMTS13 enthaltene Medium gesammelt und es erfolgte die Lyse der HEK-293-EBNA-Zellen. Die ADAMTS13-Proteine aus den Zelllysaten (L) und den Mediumproben (M) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Es folgte der Nachweis von ADAMTS13 mit dem primären goat anti-ADAMTS13 Antikörper Z797 (1:1000, Bethyl) und dem sekundären Antikörper rabbit anti-goat-HRP (1:2500, Dako). Mit dem ECL Prime Western Blotting Detection Kit wurde die Membran entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Kodak Mi im Kodak Image Station Imager.

Spur 1: Full Range Rainbow™ MW Standard. Spur 2: p.Asp235Tyr aus dem Zelllysat (L). Spur 3: p.Asp235Tyr aus dem Medium (M). Spur 4: Leer. Spur 5: wtADAMTS13 (L). Spur 6: wtADAMTS13 (M). Spur 7: Leer. Spur 8: p.Pro353Leu (L). Spur 9: p.Pro353Leu (M).

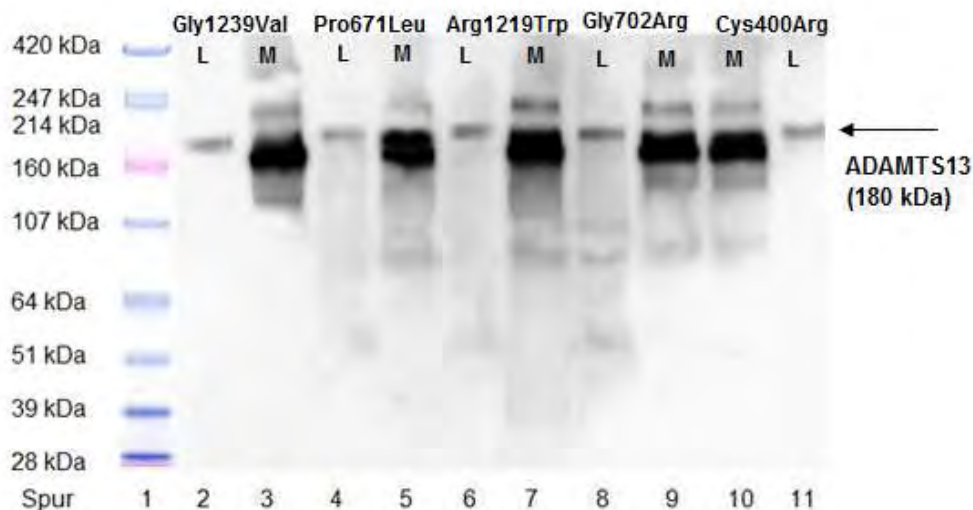


Abbildung 11: Nachweis von rekombinanten ADAMTS13-Varianten mittels Western Blotting.

Nach 48-stündiger Expression von wtADAMTS13 bzw. der ADAMTS13-Mutanten p.Gly1239Val, p.Pro671Leu, p.Arg1219Trp, p.Gly702Arg und p.Cys400Arg wurde das ADAMTS13 enthaltene Medium gesammelt und es erfolgte die Lyse der HEK-293-EBNA-Zellen. Die ADAMTS13-Proteine aus den Zelllysaten (L) und den Mediumproben (M) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Es folgte der Nachweis von ADAMTS13 mit dem primären goat anti-ADAMTS13 Antikörper Z797 (1:1000, Bethyl) und dem sekundären Antikörper rabbit anti-goat-HRP (1:2500, Dako). Mit dem ECL Prime Western Blotting Detection Kit wurde die Membran entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Kodak Mi im Kodak Image Station Imager.

Spur 1: HiMark™ Pre-Stained HMW Protein Standard. Spur 2: p.Gly1239Val aus dem Zelllysat (L). Spur 3: p.Gly1239Val aus dem Medium (M). Spur 4: p.Pro671Leu aus dem Zelllysat (L). Spur 5: p.Pro671Leu aus dem Medium (M). Spur 6: p.Arg1219Trp aus dem Zelllysat (L). Spur 7: p.Arg1219Trp aus dem Medium (M). Spur 8: p.Gly702Arg aus dem Zelllysat (L). Spur 9: p.Gly702Arg aus dem Medium (M). Spur 10: p.Cys400Arg aus dem Medium (M). Spur 11: p.Cys400Arg aus dem Zelllysat (L).

Die Western Blot Analyse (**Abbildung 10-11**) zeigte, dass p.Asp235Tyr (**Abbildung 10** Spur 2-3), wtADAMTS13 (**Abbildung 10**, Spur 5-6) p.Pro353Leu (**Abbildung 10**, Spur 8-9), p.Gly1239Val (**Abbildung 11**, Spur 2-3), p.Pro671Leu (**Abbildung 11**, Spur 4-5), p.Arg1219Trp (**Abbildung 11**, Spur 6-7), p.Gly702Arg (**Abbildung 11**, Spur 8-9) und p.Cys400Arg (**Abbildung 11**, Spur 10-11) sowohl im Zelllysats als auch im Medium detektiert wurden. Im Zelllysats war für jedes exprimierte Protein eine Bande bei ungefähr 180 kDa zu erkennen. Die Literatur bestätigt, dass ADAMTS13 ein 180 kDa großes Protein ist (Crawley et al., 2011). Im Medium wurden ADAMTS13-Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert. Die beiden unteren Banden wurden bei ungefähr 160-180 kDa detektiert, während die obere Bande bei circa 220 kDa detektiert wurde. Die Unterschiede der Molekulargewichte sind vermutlich auf Glykosylierung und andere posttranslationale Modifikationen zurückzuführen (Zhou, Tsai, 2009).

3.2. Visualisierung von VWF-Fäden

In früheren Arbeiten des Arbeitskreises wurde ein Flussassay etabliert, bei dem VWF-Fäden auf der Oberfläche von Endothelzellen visualisiert wurden. Dabei arbeiteten im mikrofluidischen Assay ein Pumpsystem (Ibidi) und eine fluidische Einheit (Ibidi) zusammen (**Abbildung 12**). Die Pumpe wurde von einem Computer aus kontrolliert. Wichtige Bestandteile waren die Zellmediumreservoirs, das μ -Slide, Schläuche und ein elektrisch gesteuertes Ventil-Set. Es wurde ein definierter unidirektionaler, laminarer Fluss des eingesetzten Mediums generiert. Bedeutende Parameter im fluidischen Assay waren der Druck, die Fließrate und der Scherstress. Das Prinzip funktionierte folgendermaßen: Die Pumpe generierte einen konstanten Druck, der die Fließrate des Mediums bestimmte. Die Fließrate war abhängig von der Viskosität des Mediums und dem Fließwiderstand des Perfusionssystems. Die Fließrate verursachte einen sogenannten Scherstress, der auf die Zellen appliziert wurde. Zur Vermeidung eines hohen Mediumverbrauchs wurde das Medium in der fluidischen Einheit zwischen zwei Reservoirs hin- und hergepumpt. Die Steuerung des definierten unidirektionalen Flusses erfolgte durch Ventile, die in der fluidischen Einheit integriert waren. Kontrolliert wurde die Pumpe selbst durch eine spezifische Software (Kroutvar, 2010).

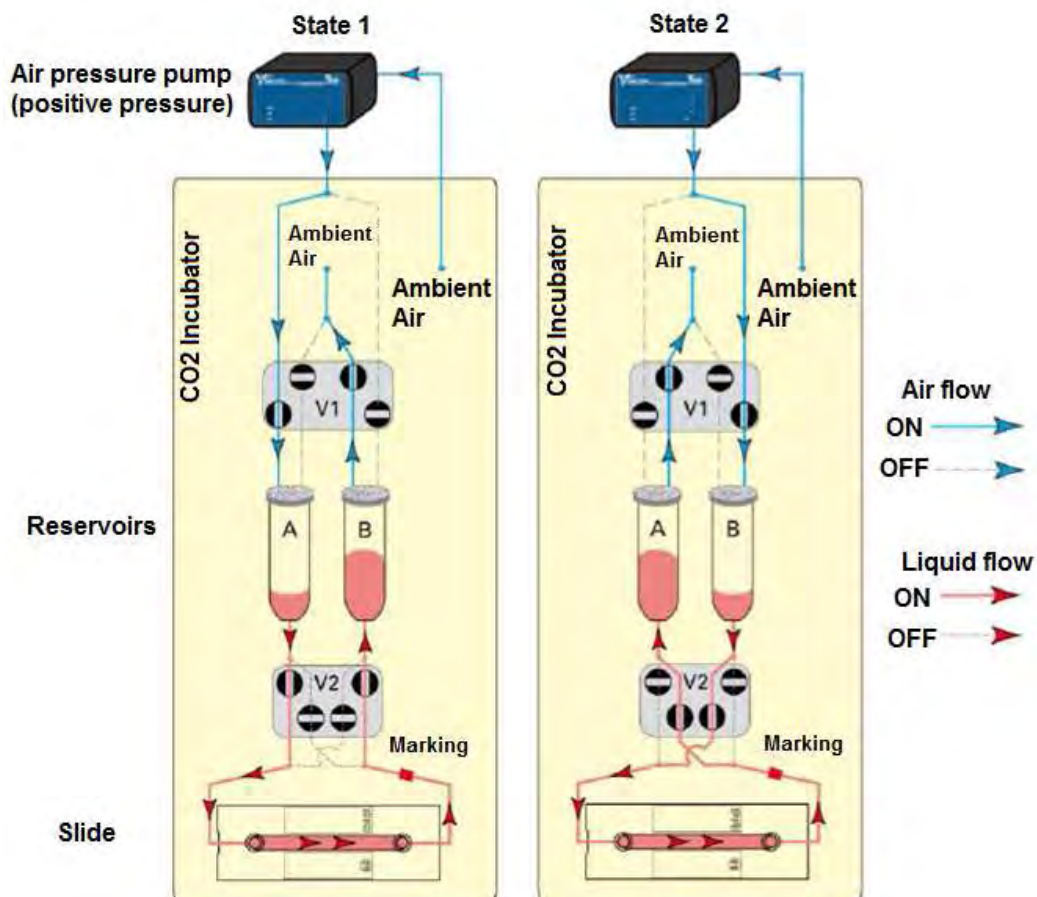


Abbildung 12: Wirkungsprinzip des Pumpensystems. Das Pumpensystem kann entweder in Zustand 1 oder in Zustand 2 betrieben werden. Es liegt in beiden Zuständen ein positiver Druck an. Nach Anlegen eines Drucks, wird ein definierter unidirektionaler, laminarer Fluss des Mediums innerhalb des μ -Slides erzeugt. Wenn das Ventil 1 (V1) sich im Zustand 1 befindet, wird die Luft aus der Pumpe in das Reservoir A gepumpt. Währenddessen wird die Luft aus Reservoir B unter Druck heraus befördert. Es entsteht ein Mediumfluss von Reservoir A nach Reservoir B. Das Ventil 2 agiert zusammen mit der vierfachen Verzweigung der Silikonschläuche als eine weitere fluidische Regelungseinheit. Das Ventil 2 befindet sich immer in einem Zustand, in dem eine der Verzweigungen der Silikonschläuche der Reservoirs entweder offen (rot markiert) oder geschlossen (grau gestrichelt) ist. Im Zustand 1 fließt das Medium von Reservoir A durch die Verzweigung, die offen ist, in das μ -Slide hinein. Das Medium fließt von links nach rechts. Im Zustand 2 wird die Luft aus der Pumpe in das Reservoir B gepumpt. Das Ventil 1 befindet sich dann im Zustand 2. Das Medium fließt dabei von Reservoir B nach Reservoir A. Das Ventil 2 ist nun so ausgerichtet, dass ein Fluss von Reservoir B nach Reservoir A ermöglicht wird, dabei verläuft die Flussrichtung im μ -Slide aber weiterhin von links nach rechts.

Quelle: Kroutvar M. (2010): *ibidi Pump Instruction Manual*. ibidi GmbH 2010, Version 1.5.0.

Die VWF-Fäden konnten in der vorliegenden Arbeit als VWF-Substrat für ADAMTS13 eingesetzt werden, um die Aktivität von ADAMTS13 zu visualisieren. Nach Kultivierung der HUVEC-Zellen in μ -slides^{0,4 luer} (2.2.1.2.2.) wurden diese an das green/yellow-Perfusion Set (ibidi) angeschlossen. In den Reservoirs des green/yellow-Perfusion Sets (ibidi) befand sich HBRS-Puffer (siehe 2.1.4.). Der Einfluss des HBRS-Puffers auf die Stabilität von VWF-Fäden wurde bereits in der Arbeitsgruppe getestet und es wurde gezeigt, dass die Fäden über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde stabil sind. Nach Platzierung des green/yellow-

Perfusion Sets (Ibidi) in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) und Einsetzen des μ -slides^{0,4 luer} (Ibidi) in die dafür speziell eingebaute Inkubationskammer (Tokai-Hit, 5 % CO₂, 37 °C) eines Fluoreszenzmikroskops (BZ-9000, Keyence), wurden die folgenden Parameter eingestellt: ein Scherstress von 5 dyn/cm², ein Druck von 10 mbar, eine Fließrate 3,8 ml/min und eine Scherrate von 500 s⁻¹ (siehe 2.2.7.).

Die Zugabe von Histamin führte zur Stimulation der HUVEC-Zellen und zur Ausbildung der VWF-Fäden durch Sekretion aus den Weibel-Palade-Körperchen an unterschiedlichen Positionen im μ -slide^{0,4 luer} (Ibidi) bei konstantem laminarem Fluss (**Abbildung 13 A-B**). Die Fädenbildung konnte circa eine Minute nach Stimulation der HUVEC-Zellen beobachtet werden. Dabei wiesen die VWF-Fäden Längen von 10 μ m bis 1 mm auf. Zur Visualisierung der VWF-Fäden diente ein Komplex aus Reagenz I und Reagenz III des Innovance VWF Ac Kit (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH). Reagenz I bestand aus Latexkügelchen, an die ein monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper aus der Maus gekoppelt war. Reagenz III bestand aus einem rekombinanten GP-Ib α -Peptid, das zwei *gain-of-function*-Mutationen aufwies. Das GP-Ib α -Peptid band an den monoklonalen anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper. Bei 40-facher Vergrößerung wurde im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) die Ausbildung der VWF-Fäden durch die Bindung des Komplexes aus GP-Ib α -Peptid, anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper und Latexkügelchen an die A1-Domänen der VWF-Multimere beobachtet (siehe 2.2.7.). Durch die Applikation des Scherstresses wurden die Fäden gestreckt, sodass die Bindungsstelle für das GP-Ib α -Peptid zugänglich wurde und sich die GP-Ib-Latexkügelchen (GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex) anlagern konnten. Sobald der Fluss gestört oder unterbrochen wurde, zogen sich die Fäden zusammen. Bei konstantem Fluss brachen die Fäden nicht ab, lediglich die HUVEC-Zellen änderten nach längerer Applikation von Scher geringfügig ihre Lage und Orientierung.

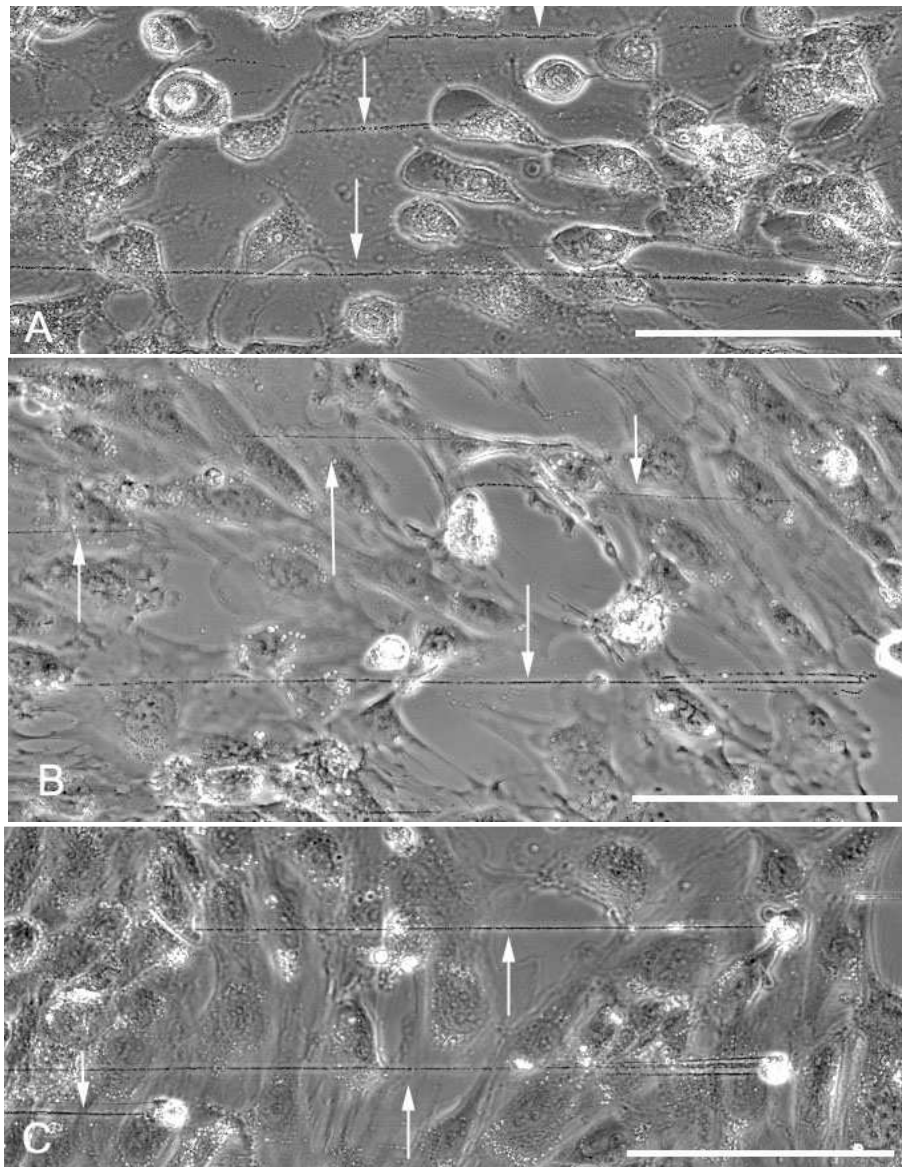


Abbildung 13: Mikrofluidischer Assay zur Visualisierung von VWF-Fäden. Die Abbildungen A-C zeigen VWF-Fäden an unterschiedlichen Positionen im Flusskanal. Im mikrofluidischen Assay wurde mit dem green/yellow-Perfusion Set (Ibidi) und dem μ -slide^{0,4 luer} (Ibidi) gearbeitet. Folgende Parameter wurden eingestellt: ein Scherstress von 5 dyn/cm^2 , ein Druck von 10 mbar, eine Fließrate $3,8 \text{ ml/min}$ und eine Scherrate von 500 s^{-1} . Zur Ausbildung der Fäden von hochmolekularen VWF-Multimeren wurden HUVEC-Zellen mit $150 \text{ }\mu\text{m}$ Histamin stimuliert. Die Visualisierung der VWF-Fäden erfolgte durch einen Komplex aus GP-Ib α -Peptid und Latexkügelchen mit dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper. Dieser Komplex trat in Wechselwirkung mit den A1-Domänen der VWF-Multimere, sodass die Fädenbildung bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet werden konnte. Der Maßstab beträgt $100 \text{ }\mu\text{m}$.

Um zu bestätigen, dass der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen wirklich an VWF band und diesen visualisierte, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe 2.2.8). Die Bildung der VWF-Fäden wurde zunächst eine Stunde bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden zunächst die HUVEC-Zellen und die VWF-Fäden unter Fluss mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Detektion von

VWF erfolgte mittels eines primären rabbit anti-VWF Antikörpers (1:1000, Dako) und des Sekundärantikörpers goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen). Der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonalen Maus anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen konnte direkt mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) detektiert werden. Mithilfe des GFP-Filters (grün) und des TRITC-Filters (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) erfolgte die Auswertung (**Abbildung 14**). Der VWF in Weibel-Palade-Körperchen (runde bis ovale Formen) und die sekretierten VWF-Fäden auf der Oberfläche der HUVEC-Zellen wurden grün markiert (**Abbildung 14 B**). Im TRITC-Filter waren die rot markierten GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexe zu sehen (**Abbildung 14 C**), die lediglich an die extrazellulären VWF-Fäden banden. In der Überlagerung (**Abbildung 14 D**) war die Kolo-kalisation des VWFs und der GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexe in einem gelblich-orangen Ton zu sehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung der Nachweis der Ausbildung von VWF-Fäden durch Stimulation mit Histamin in Anwesenheit eines Scherflusses gezeigt werden konnte. Durch Zugabe von Histamin sekretierten die Weibel-Palade-Körperchen vermehrt VWF-Multimere. Durch den Einfluss des Scherstress bildeten die VWF-Multimere extrazellulär hochmolekulare Fäden in einem konstanten laminaren Fluss, die erfolgreich durch die Bindung der GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexe visualisiert werden konnten.

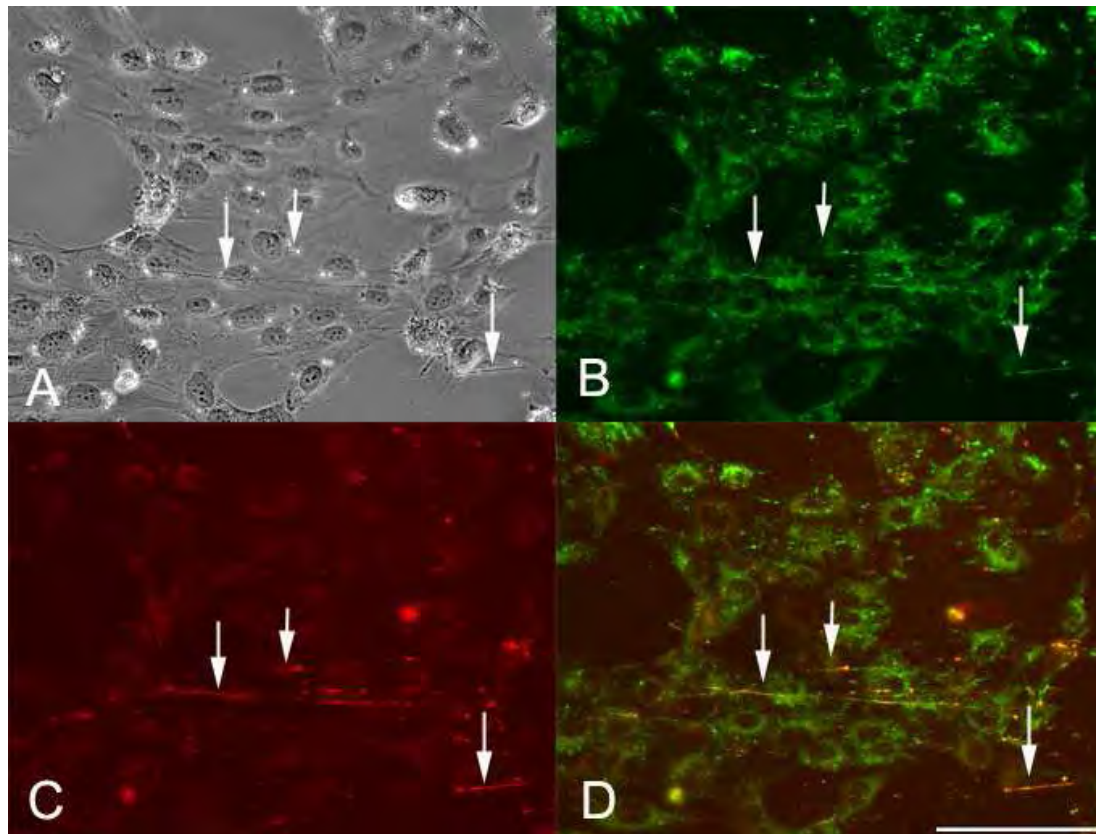


Abbildung 14: Immunfluoreszenz von VWF-Fäden und GP-Ib-Latexkügelchen auf der Oberfläche von HUVEC-Zellen. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. In (A) wurden die Zellen und die VWF-Fäden im Durchlichtkanal fotografiert. In (B) wurde der VWF mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab die Überlagerung (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

3.3. Mikrofluidischer Assay zum Nachweis des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13

Der mikrofluidische Assay zur Analyse des Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13 wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. Ziel der Analyse war die Bestimmung der Zeit zum Abbau von VWF-Fäden durch wtADAMTS13 und die daraus resultierende Ermittlung der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13.

Vorbereitet wurde der mikrofluidische Assay auf die gleiche Weise wie bereits in Abschnitt 3.2. beschrieben. Einziger Unterschied bestand in der Zugabe des 20-fachen wtADAMTS13-Konzentrats nach vollständiger Ausbildung von VWF-Fäden in einem konstanten laminaren Fluss. Es wurde mit einer Konzentration von 100 ng/ml wtADAMTS13 gearbeitet.

Nach Zugabe des wtADAMTS13-Konzentrats wurde der Versuch für eine Stunde bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Mithilfe einer Stoppuhr wurden der Beginn des proteolytischen Abbaus und das Ende des proteolytischen Abbaus der VWF-Fäden durch wtADAMTS13 gemessen. Der Einfluss von Proteinen im Medium von untransfizierten HEK-293-EBNA-Zellen wurde bereits in der Arbeitsgruppe geprüft und war negativ.

Der proteolytische Abbau der VWF-Fäden startete direkt nach Zugabe des wtADAMTS13-Konzentrats und war nach drei Minuten vollständig beendet. Dies wurde in einer Dreifachbestimmung ermittelt. **Abbildung 15 A-D** zeigt die VWF-Fäden in einem bestimmten Sichtfeld an zwei Positionen im μ -slide^{0,4 luer} (Ibidi) vor und nach Zugabe von wtADAMTS13. Die Angabe der Zeit bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem keine Veränderung der VWF-Fäden mehr sichtbar war. In den Ausschnitten ist deutlich erkennbar, dass die Fäden nach drei Minuten vollständig durch wtADAMTS13 proteolysiert wurden. Da der Abbau in allen drei Versuchen die gleiche Zeit von drei Minuten beanspruchte, wurde diese proteolytische Aktivität von wtADAMTS13 als 100 % definiert. Die Verschiebung der HUVEC-Zellen ist durch den Fluss bedingt. Unter Fluss verändern HUVEC-Zellen nach einiger Zeit ihre Position, sodass die Vorher- und Nachherbilder teilweise Veränderungen in der Lage und Orientierung der HUVEC-Zellen aufwiesen.

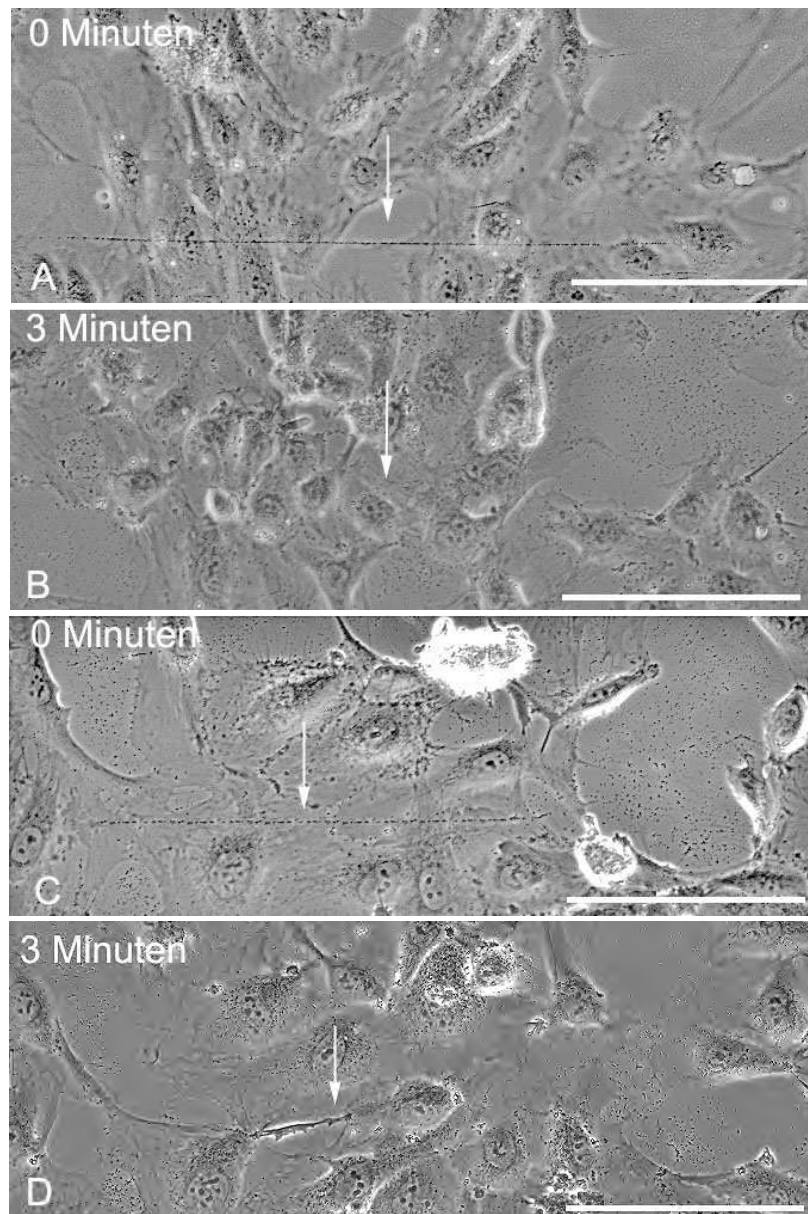


Abbildung 15: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von wtADAMTS13 markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle drei Minuten nach Zugabe von wtADAMTS13 gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von wtADAMTS13 zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Als zusätzlicher Nachweis der Proteolysierung der VWF-Fäden durch wtADAMTS13 wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe 2.2.8.). Im TRITC-Filter (rot) sollte bei nicht vorhandenem proteolytischen Abbau durch wtADAMTS13 die Bindung des Komplexes aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen an VWF sichtbar sein. Da hier aber die VWF-Fäden durch wtADAMTS13 nach drei Minuten vollständig abgebaut

wurden, waren keine VWF-Fäden mit gebundenem GP-Ib-Latexkugeln-Komplex sichtbar (**Abbildung 16 C**). Es war lediglich die Bindung des GP-Ib-Latexkugeln-Komplex an die Zellmembran zu sehen. Bei der Sekretion von VWF fusionieren die Weibel-Palade-Körperchen mit der Zellmembran, sodass vermutlich die äußeren Umrisse der Weibel-Palade-Körperchen im TRITC-Filter (rot) fotografiert wurden. Im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) wurden die mit VWF-angereicherten Weibel-Palade-Körperchen markiert (**Abbildung 16 B**). Die Überlagerung bestätigte diese Ergebnisse und zeigte, dass keine VWF-Fäden nach Proteolysierung durch wtADAMTS13 mehr zu erkennen waren (**Abbildung 16 D**). Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde dementsprechend nachgewiesen, dass wtADAMTS13 die VWF-Fäden innerhalb von drei Minuten vollständig proteolytisierte.

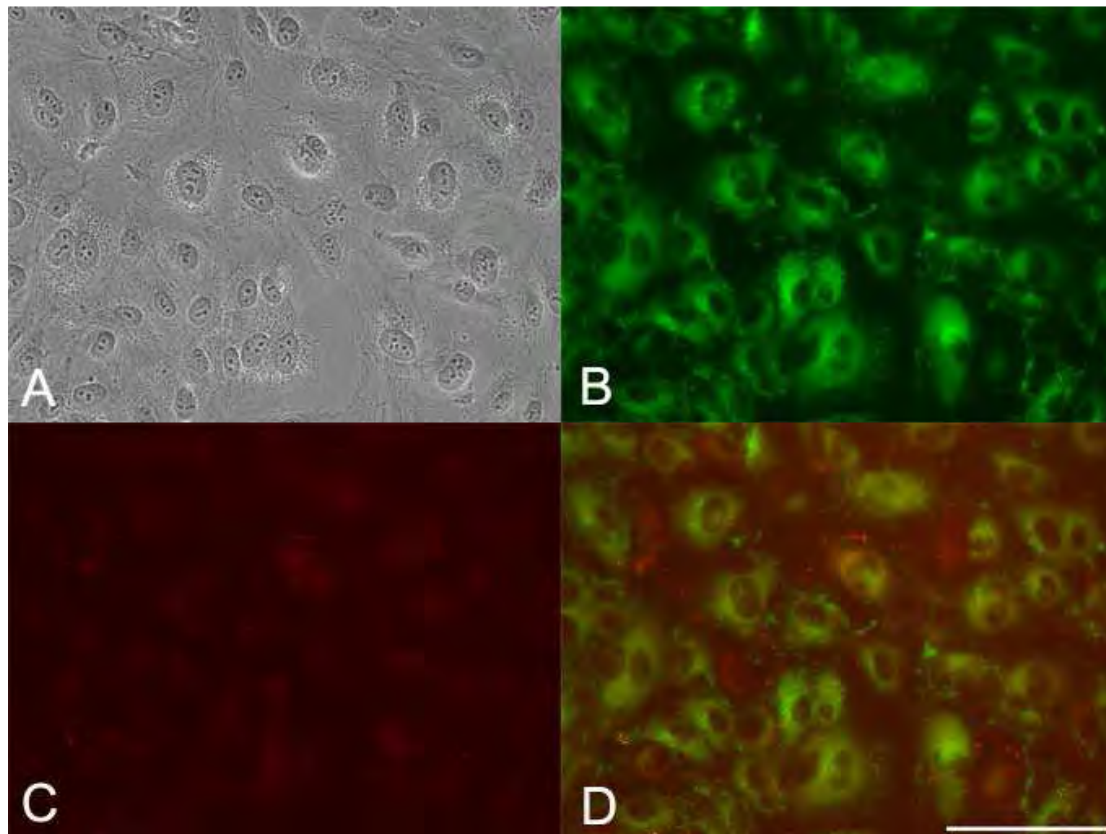


Abbildung 16: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkugeln mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

Für alle weiteren Ergebnisse und Analysen gilt, dass der mikrofluidische Assay nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt wurde und nach der in Abschnitt 3.2. erläuterten Wirkungsweise funktionierte. Für jede zu untersuchende Mutante wurden die Versuche in Dreifachbestimmung, mit dem Ziel die Zeit zum Abbau von VWF-Fäden und die daraus resultierende Ermittlung der proteolytischen Aktivität zu bestimmen, ausgeführt. Die Angabe der Zeit in allen Ausschnitten bezieht sich auf den Zeitpunkt, ab dem sich die Länge der VWF-Fäden nicht mehr veränderte. Zusätzlich gilt, dass die Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.2.8.) für alle Analysen nach dem gleichen Prinzip durchgeführt wurde und stets dem Nachweis der proteolytischen Aktivität der zu untersuchenden Mutante galt.

Des Weiteren muss für die weiteren Ergebnisse beachtet werden, dass wtADAMTS13 in einer getesteten Konzentration von 100 ng/ml für den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden drei Minuten benötigte und deshalb ein vollständiger Abbau innerhalb von drei Minuten als 100 % proteolytische Aktivität definiert wurde. Die Konzentrationen für die weiteren Analysen wurden in Abstimmung der ELISA-Werte und der Ergebnisse des Western Blots berechnet und entsprachen dem natürlichen Verhältnis, das in USS-Patienten vorliegt. Aufgrund der Tatsache, dass die untersuchten ADAMTS13-Mutationen die Expression und Sekretion beeinflussen, wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Mutanten gearbeitet, während die proteolytische Aktivität stets in Korrelation mit der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 gesetzt wurde.

3.4. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Mutanten der CUB1-Domäne

Im Rahmen der Thematik wurden die Mutanten p.Arg1219Trp und p.Gly1239Val mithilfe des mikrofluidischen Assays (siehe 2.2.7., 3.2.) auf ihre proteolytische Aktivität getestet. Beide Mutationen befinden sich in der CUB1-Domäne der Protease ADAMTS13. Es wurde mit einer Konzentration von 20 ng/ml der Mutante p.Arg1219Trp und mit einer Konzentration von 40 ng/ml der Mutante p.Arg1239Trp gearbeitet.

Die Mutante p.Arg1219Trp benötigte sieben Minuten für den vollständigen proteolytischen Abbau der VWF-Fäden im mikrofluidischen Assay. Dabei startete die Proteolysierung direkt nach Zugabe des 20-fachen Konzentrats. **Abbildung 17 A-D** zeigt die VWF-Fäden im Durchlichtkanal an zwei verschiedenen Positionen im μ -

slide^{0,4 luer} (Ibidi) vor und nach Zugabe von p.Arg1219Trp. Die proteolytische Aktivität von p.Arg1219Trp war vergleichbar mit wtADAMTS13, dessen proteolytische Aktivität als 100 % bei einer Konzentration von 100 ng/ml und einem proteolytischen Abbau von drei Minuten definiert wurde. Trotz der Tatsache, dass wtADAMTS13 in einer Konzentration von 100 ng/ml im mikrofluidischen Assay getestet wurde (siehe 3.3.) und p.Arg1219Trp in einer circa 5-fach geringeren Konzentration im mikrofluidischen Assay eingesetzt wurde, benötigte p.Arg1219Trp ungefähr nur doppelt so viel Zeit für den proteolytischen Abbau der VWF-Multimere. Folglich konnte die proteolytische Aktivität von p.Arg1219Trp als 100 % eingestuft werden.

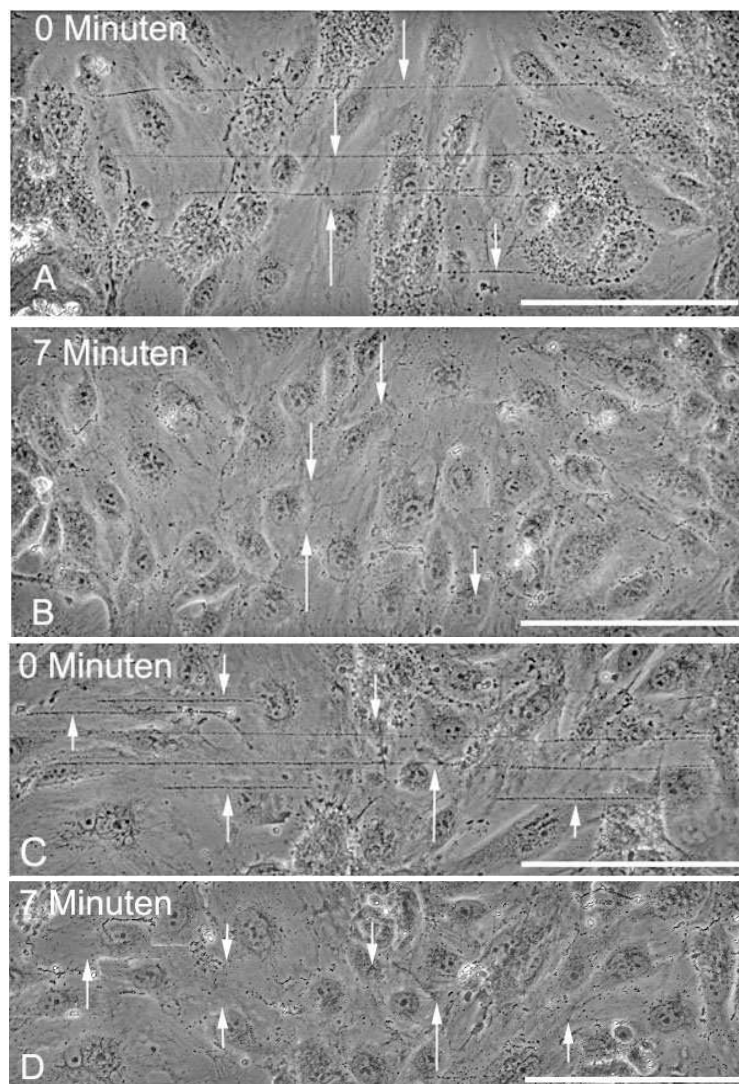


Abbildung 17: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Arg1219Trp. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle sieben Minuten nach Zugabe von p.Arg1219Trp gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Arg1219Trp zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.2.8.) wurde die Proteolysierung der VWF-Fäden durch p.Arg1219Trp bestätigt. Das Ergebnis (**Abbildung 18 A-D**) deckte sich mit den Ergebnissen für den wtADAMTS13 (siehe 3.3.). Sowohl im Durchlichtkanal (**Abbildung 18 A**) als auch im GFP-Filter (grün) (**Abbildung 18 B**) und im TRITC-Filter (rot) (**Abbildung 18 C**), und nach Erstellen der Überlagerung (**Abbildung 18 D**) waren keine VWF-Fäden zu erkennen. Im TRITC-Filter (rot) war lediglich die Bindung des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex an die Zellmembran nach vermutlicher Fusionierung der Weibel-Palade-Körperchen mit der Zellmembran zu sehen. Zusätzlich war zu erkennen, dass im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) die mit VWF-angereicherten Weibel-Palade-Körperchen grün markiert wurden. Es wurde daher nachgewiesen, dass die Mutante p.Arg1219Trp die VWF-Fäden innerhalb von sieben Minuten proteolysierte und die proteolytische Aktivität mit der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 korrelierte.

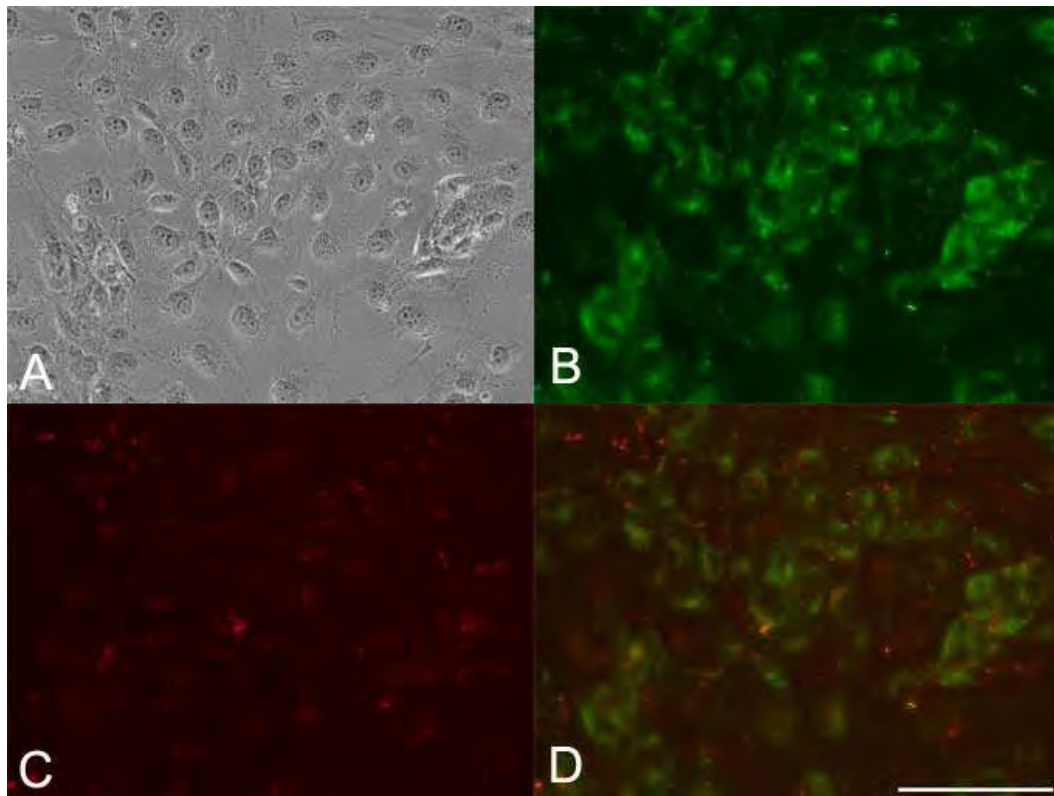


Abbildung 18: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Arg1219Trp. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

Nach Zugabe des p.Gly1239Val-Konzentrats wurde der sofortige proteolytische Abbau der VWF-Fäden beobachtet, der nach sechs Minuten vollständig war. **Abbildung 19 A-D** zeigt, dass vor Zugabe des p.Gly1239Val-Konzentrats gestreckte VWF-Fäden im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) zu beobachten waren und, dass nach Zugabe des p.Gly1239Val-Konzentrats die VWF-Fäden innerhalb von sechs Minuten gänzlich proteolysiert wurden. Die proteolytische Aktivität von p.Gly1239Val korrelierte mit der proteolytischen Aktivität von p.Arg1219Trp und wtADAMTS13 (siehe 3.3.). Der wtADAMTS13 wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml im mikrofluidischen Assay getestet, die Mutante p.Arg1219Trp wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt und die Mutante p.Gly1239Val wies im Vergleich zu wtADAMTS13 eine circa 2,5-fache geringere Konzentration auf. Nichtsdestotrotz benötigte die Mutante p.Gly1239Val nur die doppelte Zeit für den proteolytischen Abbau der VWF-Multimere. Daher konnte die proteolytische Aktivität von p.Gly1239Val mit der proteolytischen Aktivität von p.Arg1219Trp und wtADAMTS13 gleichgesetzt und als 100 % definiert werden.

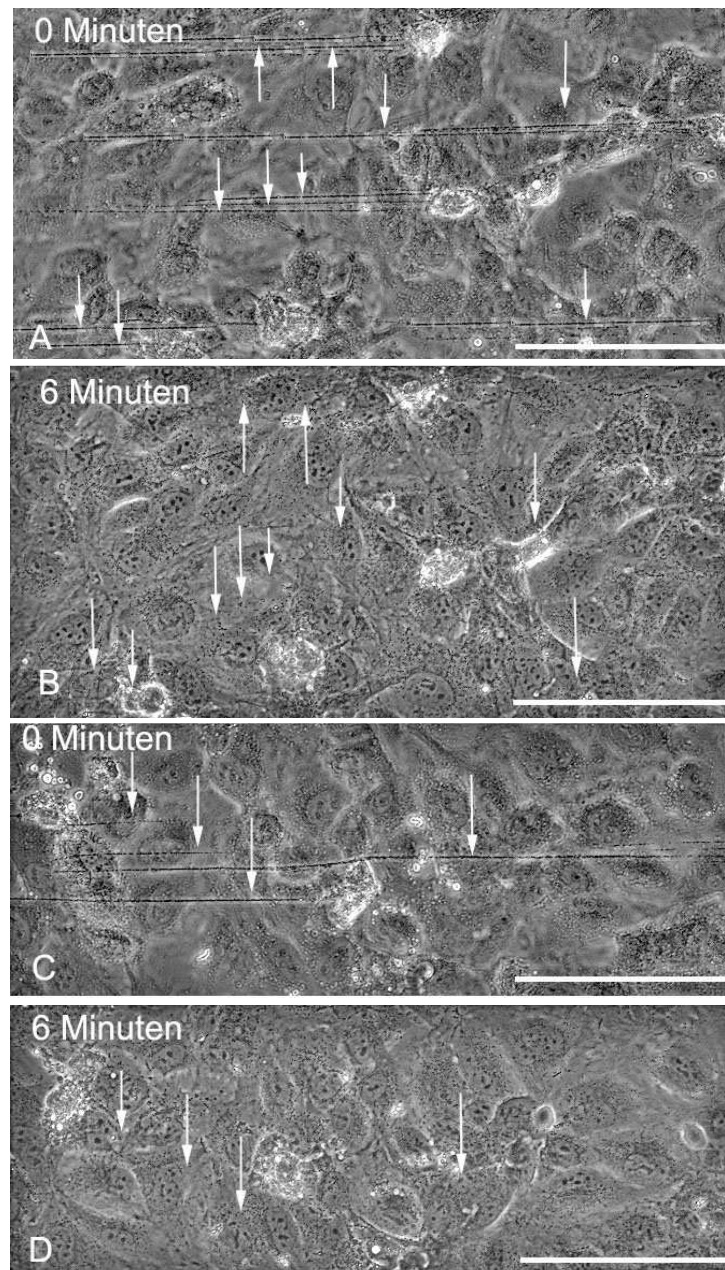


Abbildung 19: Mikrofuidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly1239Val. Der mikrofuidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Gly1239Val markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle sechs Minuten nach Zugabe von p.Gly1239Val gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Gly1239Val zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Auch hier wurde mit der Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen, dass keine VWF-Fäden in allen untersuchten Kanälen des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) sichtbar waren (**Abbildung 20 A-D**) und der proteolytische Abbau nach sechs Minuten endete. Die Ergebnisse stimmten mit den Analysen für wtADAMTS13 (siehe 3.3.) und p.Arg1219Trp überein und bestätigten, dass die proteolytische

Aktivität von p.Gly1239Val mit der proteolytischen Aktivität von p.Arg1219Trp und wtADAMTS13 (siehe 3.3.) übereinstimmte.

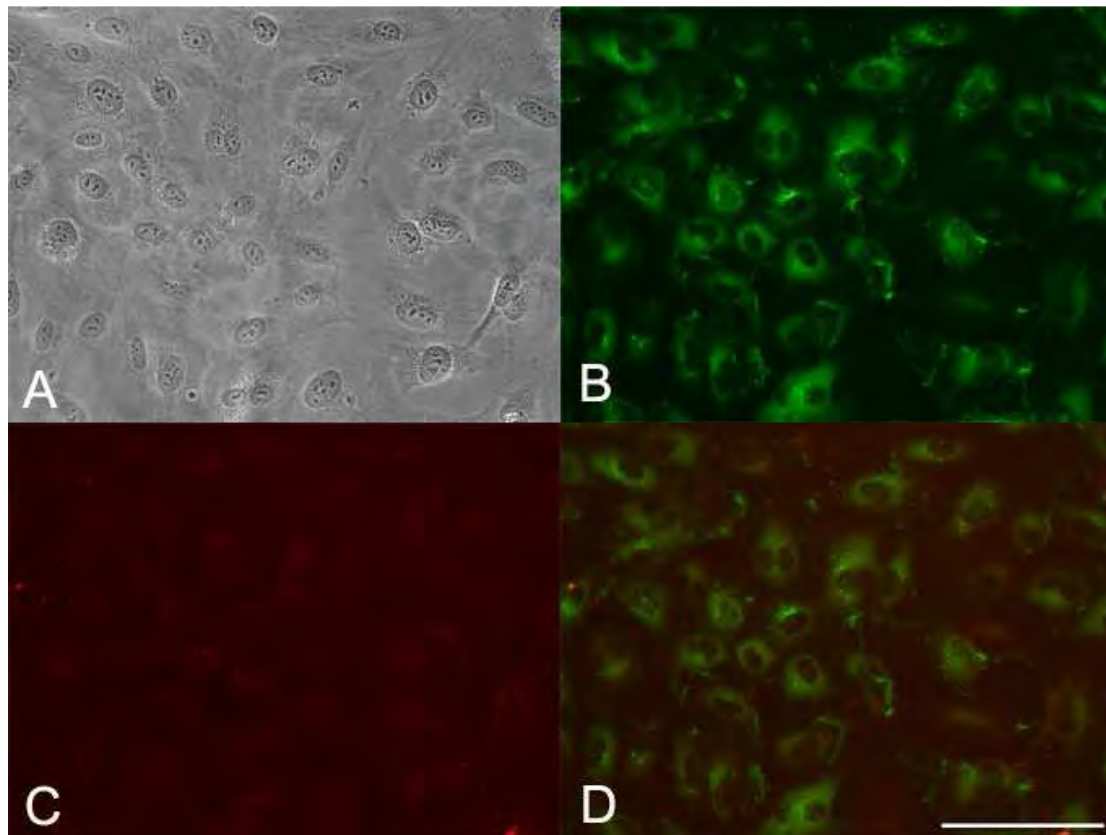


Abbildung 20: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly1239Val. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonalen anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkugeln mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

3.5. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Mutanten der TSP1-1-2-Regionen

Zur weiteren Analyse des Abbaus von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Mutanten wurde die Mutante p.Gly702Arg im mikrofluidischen Assay (siehe 2.2.7., 3.2.) getestet. Die Mutation Gly702Arg befindet sich in der TSP1-2-Region der Protease ADAMTS13. Zusätzlich wurde die Mutation Cys400Arg, die in der TSP1-1-Region der Protease ADAMTS13 lokalisiert ist, untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen der Mutanten p.Gly702Arg und p.Cys400Arg lagen bei 20 ng/ml.

Abbildung 21 A-D wurde vor und fünfzehn Minuten nach Zugabe des p.Gly702Arg-Konzentrats erstellt und zeigt, dass die VWF-Fäden nach fünfzehn Minuten durch

p.Gly702Arg vollständig proteolysiert wurden. Unter Einbeziehung der Definition, dass 100 ng/ml wtADAMTS13 innerhalb von drei Minuten die VWF-Fäden vollständig proteolysierte und dies einer proteolytischen Aktivität von 100 % entsprach, ergab sich für die Mutante p.Gly702Arg in Anbetracht der eingesetzten Konzentration von 20 ng/ml und der Zeit des proteolytischen Abbaus von fünfzehn Minuten eine vergleichbare proteolytische Aktivität.

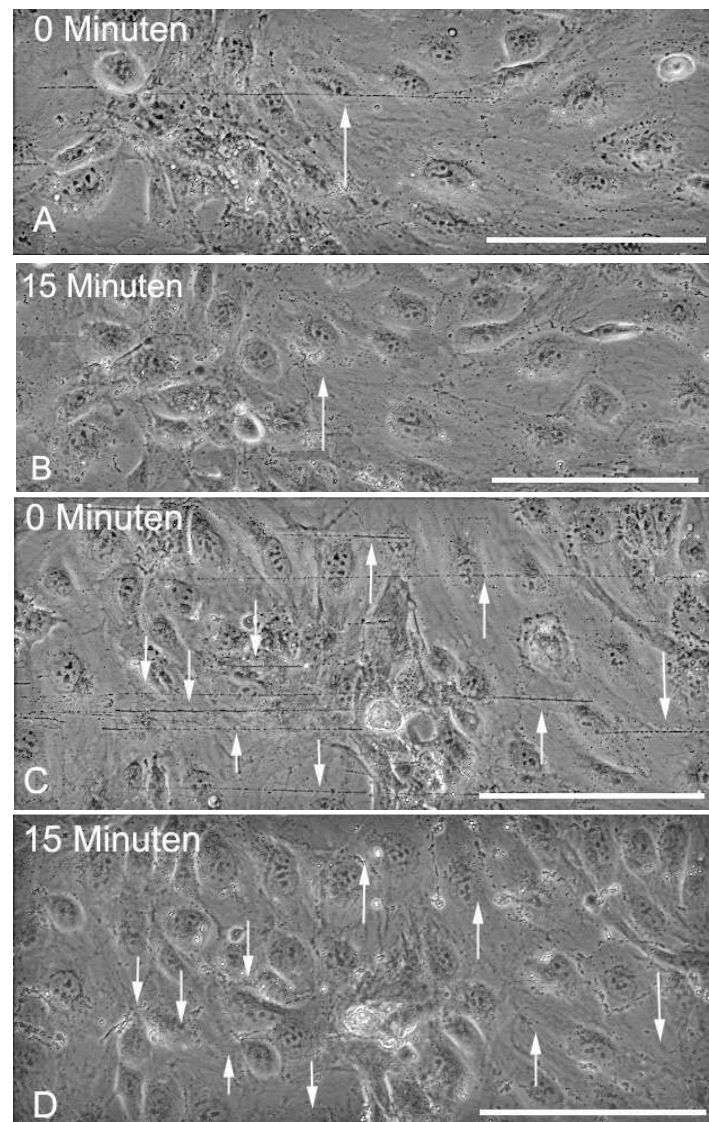


Abbildung 21: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly702Arg. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Gly702Arg markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle fünfzehn Minuten nach Zugabe von p.Gly702Arg gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Gly702Arg zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Die Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.2.8.) bestätigte die Ergebnisse aus dem mikrofluidischen Assay mit p.Gly702Arg, dass die VWF-Fäden durch p.Gly702Arg

vollständig proteolysiert wurden (**Abbildung 22 A-D**). Es waren keine VWF-Fäden im Durchlichtkanal (**Abbildung 22 A**), im GFP-Filter (grün) (**Abbildung 22 B**), im TRITC-Filter (rot) (**Abbildung 22 C**) und in der Überlagerung (**Abbildung 22 D**) zu erkennen. Wie auch bei den bisher besprochenen Ergebnissen (siehe 3.3., 3.4.) war im TRITC-Filter (rot) die Bindung des Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkugeln an die Zellmembran nach Fusionierung der Weibel-Palade-Körperchen mit der Zellmembran zu sehen. Im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) waren die mit VWF-angereicherten Weibel-Palade-Körperchen zu erkennen.

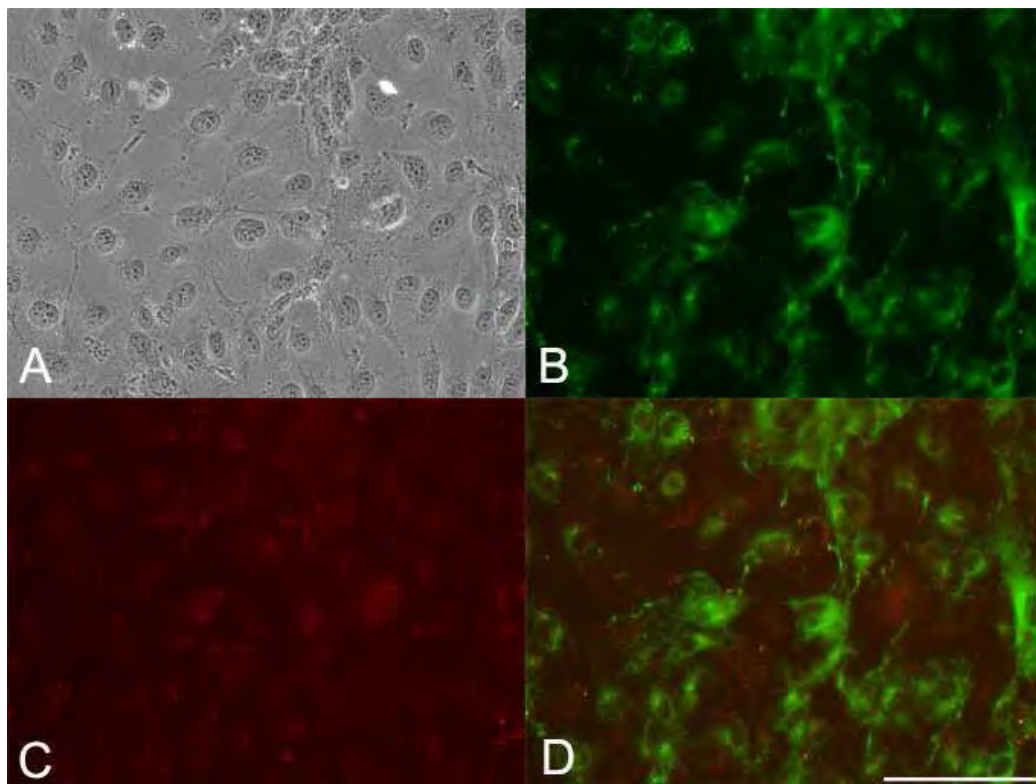


Abbildung 22: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly702Arg. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonalen anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkugeln mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

Der proteolytische Abbau der VWF-Fäden durch p.Cys400Arg wurde wie alle anderen Analysen (siehe 3.3., 3.4.) sechszig Minuten im Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence) beobachtet und endete nach dreißig Minuten (**Abbildung 23 A-D**).

An einzelnen Positionen im Flusskanal befanden sich nach dreißig Minuten geringe Reste von geschnittenen VWF-Fäden, die auch nach sechszig Minuten nicht mehr proteolysiert wurden. Nach sechszig Minuten wurden die Versuche mit p.Cys400Arg beendet und die geschnittenen VWF-Fäden lagen weiterhin in dergleichen Form vor wie nach dreißig Minuten. Dabei wiesen die VWF-Fäden Längen von 10 bis 30 μm auf. In Abhängigkeit der Definition der proteolytischen Aktivität von 100 % für wtADAMTS13 wurde die proteolytische Aktivität für p.Cys400Arg auf 50 % eingestuft.

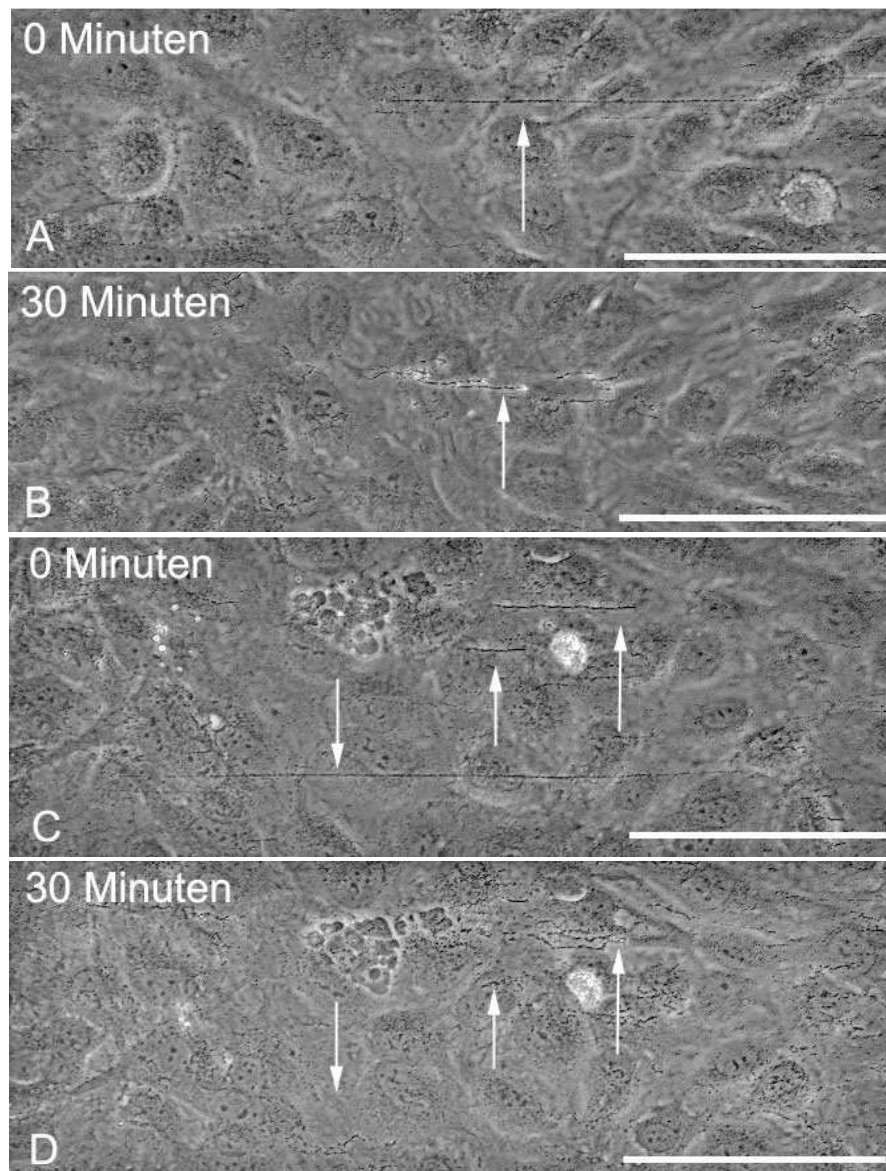


Abbildung 23: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Cys400Arg. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Cys400Arg markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle dreißig Minuten nach Zugabe von p.Cys400Arg gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Cys400Arg zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 μm .

Zur Kontrolle der Ergebnisse des mikrofluidischen Assays mit der Mutante p.Cys400Arg wurden der VWF und der GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex mithilfe der Immunfluoreszenz angefärbt (**Abbildung 24 A-D**). Dabei wurde der VWF mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper markiert, sodass die proteolysierten Reste der VWF-Fäden durch die Mutante p.Cys400Arg sowie die mit VWF-angereicherten Weibel-Palade-Körperchen eindeutig im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) zu erkennen waren (**Abbildung 24 B**). Die Markierung des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes und der Zellmembran, an die Weibel-Palade-Körperchen fusionierten, sowie die zerschnittenen Reste der VWF-Fäden erfolgte mit einem rot-fluoreszierenden Antikörper und wurde im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops (Keyence) fotografiert (**Abbildung 24 C**). Auch im Durchlichtkanal (**Abbildung 24 A**) und in der Überlagerung (**Abbildung 24 D**) waren die zerschnittenen VWF-Fäden durch p.Cys400Arg erkennbar. Besonders die Überlagerung ließ zu, dass die Kolo-kalisation des VWFs und des GP-Ib-Latexkügelchen in einem gelblich-orangen Ton gut zu erkennen war.

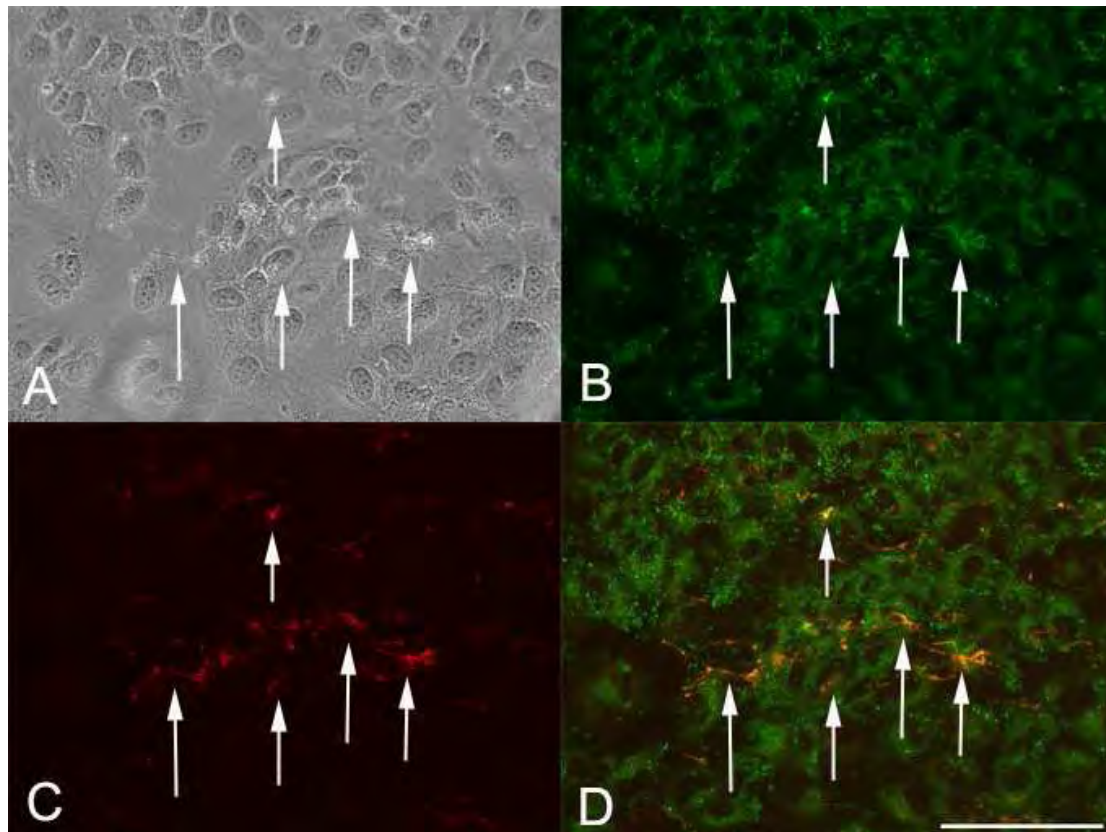


Abbildung 24: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Cys400Arg. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkugeln mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

3.6. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Spacer-Domäne

Die Mutation Pro671Leu befindet sich in der Spacer-Domäne der Protease ADAMTS13. p.Pro671Leu wurde in einer Konzentration von 45 ng/ml im mikrofluidischen Assay (siehe 2.2.7., 3.2.) analysiert.

Nach Zugabe des 20-fachen Konzentrats der Mutante p.Pro671Leu stoppte der proteolytische Abbau der VWF-Fäden nach zwanzig Minuten. **Abbildung 25 A-D** zeigt die Ergebnisse aus dem mikrofluidischen Assay mit der Mutante p.Pro671Leu. Nur noch an einzelnen Positionen im Flusskanal befanden sich nach zwanzig Minuten nicht vollständig proteolysierte Formen von VWF-Fäden in einer Größe von 10 bis 30 μ m, die auch nach sechzig Minuten nicht mehr proteolysiert wurden. Die

proteolytische Aktivität, die in Abhängigkeit der Definition der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 bestimmt wurde, lag bei 33 %.

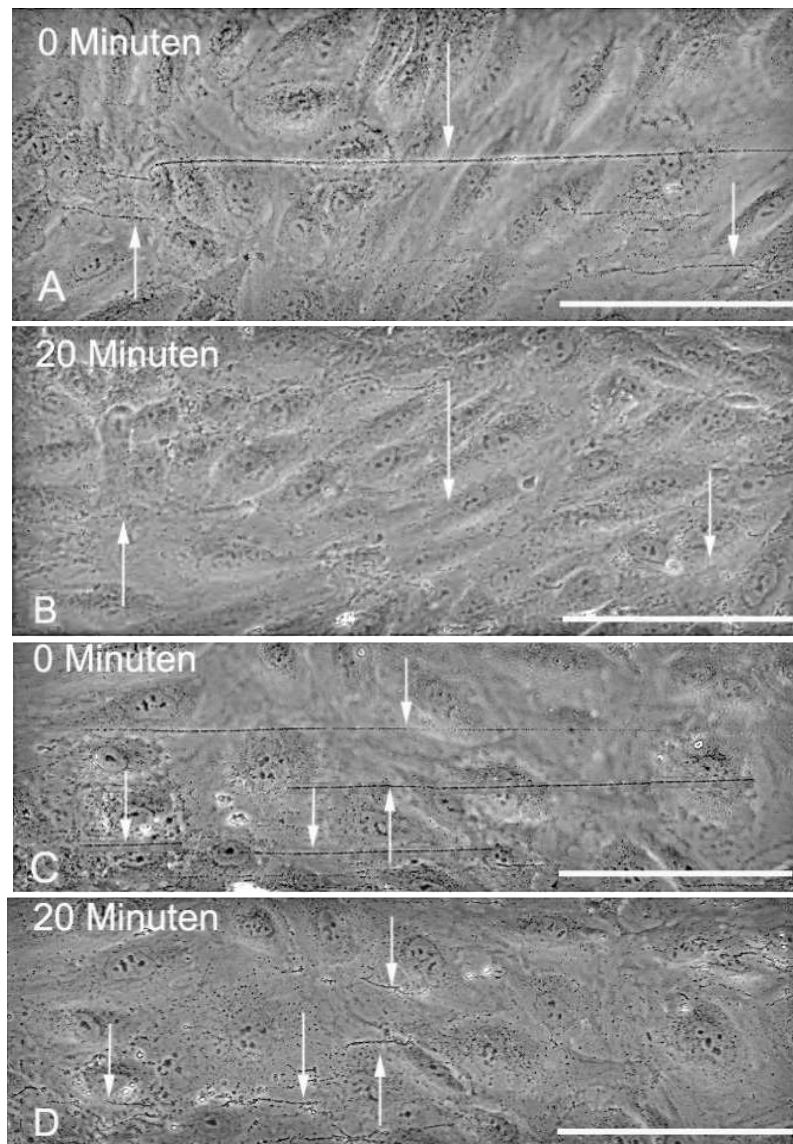


Abbildung 25: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro671Leu. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Pro671Leu markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle zwanzig Minuten nach Zugabe von p.Pro671Leu gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Pro671Leu zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Zur deutlicheren Visualisierung der nicht vollständig proteolysierten VWF-Fäden durch p.Pro671Leu nach zwanzig Minuten wurden die geschnittenen VWF-Fäden nach Proteolysierung durch p.Pro671Leu und der GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex mithilfe der Immunfluoreszenz angefärbt (**Abbildung 26 A-D**). Besonders gut waren die geschnittenen VWF-Fäden in der Überlagerung in einem gelblich-orangen Ton zu

erkennen (**Abbildung 26 D**). Im GFP-Filter (grün) waren der geschnittene extrazelluläre VWF und der in den Weibel-Palade-Körperchen angereicherte VWF durch die Markierung mit einem grün-fluoreszierenden Antikörper zu sehen (**Abbildung 26 B**), während im TRITC-Filter (rot) die minimalen Reste der Bindung des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex an den extrazellulären VWF und die Zellmembran nach Fusion mit den Weibel-Palade-Körperchen fotografiert wurden (**Abbildung 26 C**). Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigte die Ergebnisse aus dem mikrofluidischen Assay und wies nach, dass nach zwanzig Minuten kein weiterer Abbau durch die Mutante p.Pro671Leu stattfand.

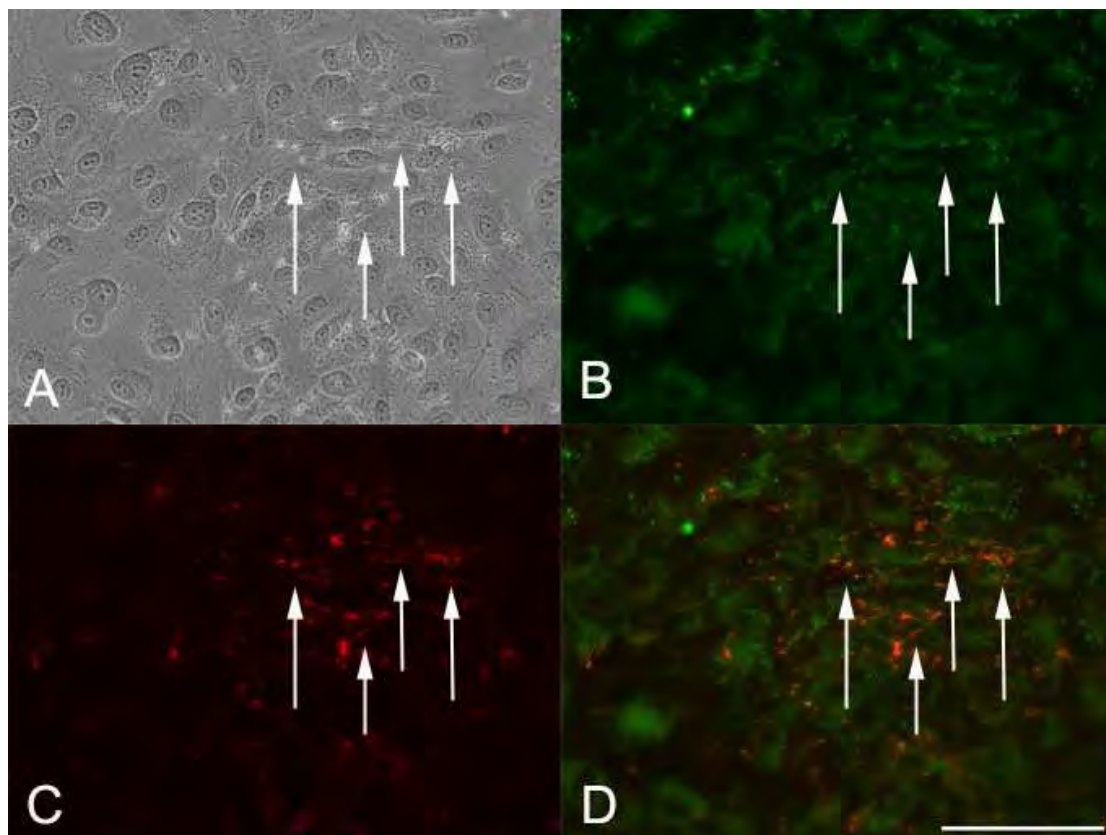


Abbildung 26: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro671Leu. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

3.7. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Disintegrin-Domäne

Im Zusammenhang der Thematik wurde die Mutation Pro353Leu, die sich in der Disintegrin-Domäne der Protease ADAMTS13 befindet, untersucht. Im mikrofluidischen Assay (siehe 2.2.7., 3.2.) wurde p.Pro353Leu in einer Konzentration von 45 ng/ml getestet.

Für die Mutante p.Pro353Leu wurde das Einsetzen des proteolytischen Abbaus nach drei Minuten und nach dreiundzwanzig Minuten ein vollständiger Abbau der VWF-Fäden beobachtet (**Abbildung 27 A-D**). Die proteolytische Aktivität betrug 29 % in Anbetracht der Definition der proteolytischen Aktivität von 100 % für wtADAMTS13.

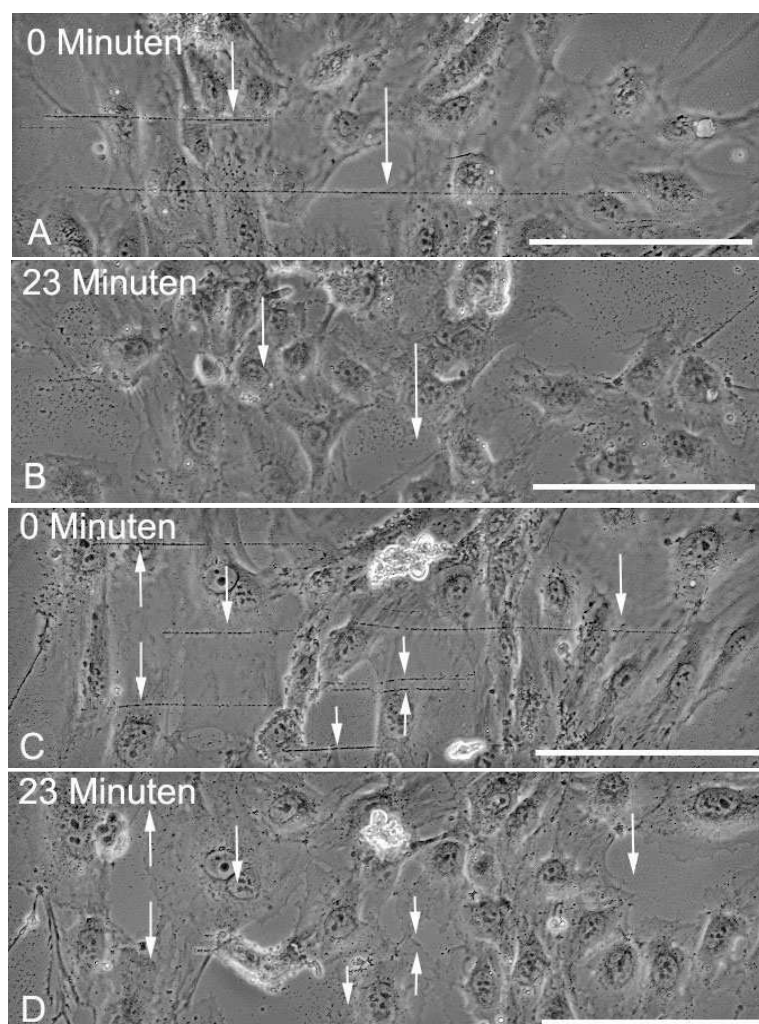


Abbildung 27: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro353Leu. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Pro353Leu markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle dreiundzwanzig Minuten nach Zugabe von p.Pro353Leu gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Pro353Leu zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Im nächsten Schritt wurde mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt, dass p.Pro353Leu die VWF-Fäden vollständig nach dreiundzwanzig Minuten proteolytisierte (**Abbildung 28 A-D**). Die gleichen Ergebnisse wurden bereits mit wtADAMTS13 (siehe 3.3.), p.Gly1239Val (siehe 3.4.) und p.Arg1219Trp (siehe 3.4.) erreicht. **Abbildung 28 A-D** zeigt keine erkennbaren VWF-Fäden und lässt darauf schließen, dass p.Pro353Leu an der A2-Domäne der einzelnen VWF-Multimere, die die gestreckten Fäden bildeten, schnitt und damit die hochmolekularen VWF-Fäden innerhalb von dreiundzwanzig Minuten proteolytisierte.

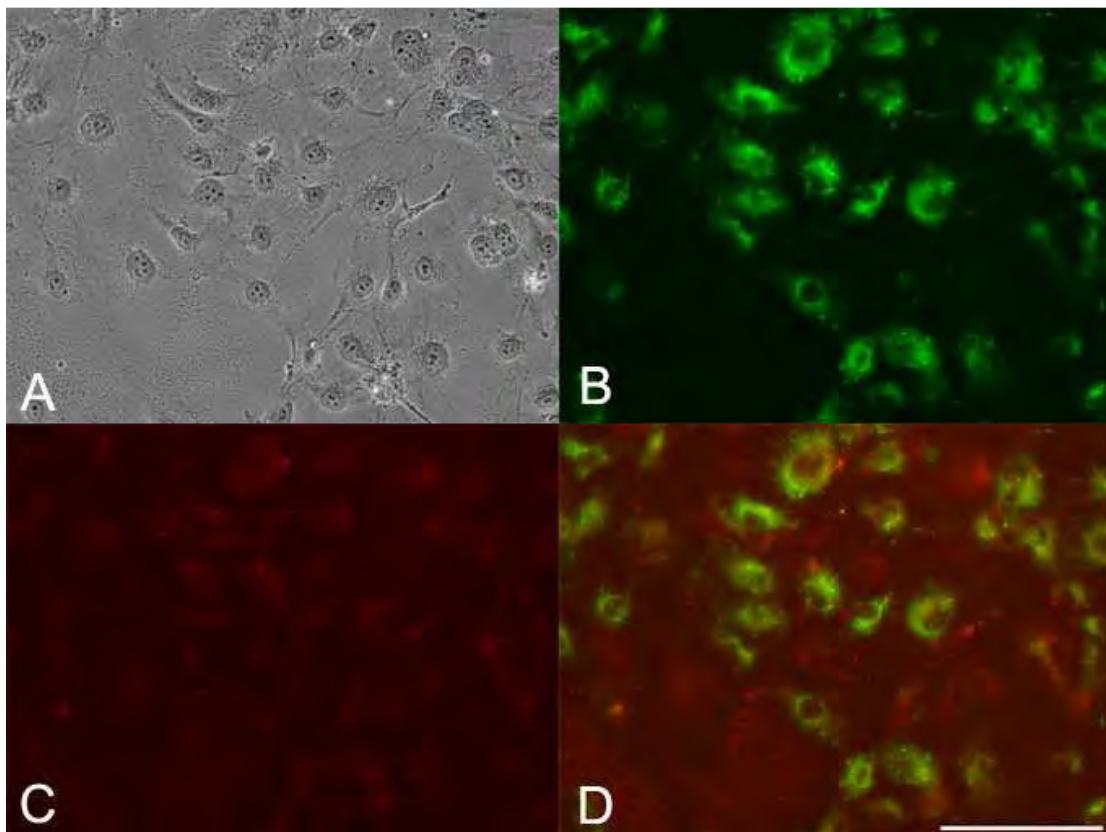


Abbildung 28: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro353Leu. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

3.8. Mikrofluidischer Assay zum proteolytischen Abbau von VWF-Fäden durch eine ADAMTS13-Mutante der Metalloprotease-Domäne

Zur Überprüfung des Einflusses der katalytischen Domäne der Protease ADAMTS13 wurde die Mutante p.Asp235Tyr in einer Konzentration von 20 ng/ml im

mikrofluidischen Assay (siehe 2.2.7., 3.2.) getestet. Der proteolytische Abbau der VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr war kaum sichtbar bzw. an einigen Positionen im Flusskanal nur in sehr geringer Form zu erkennen. **Abbildung 29 A-D** veranschaulicht, dass die VWF-Fäden nach vierzig Minuten durch p.Asp235Tyr nahezu garnicht proteolysiert wurden. Auch nach sechszig Minuten konnte keine Veränderung zu dem Zustand nach vierzig Minuten festgestellt werden. Dies zeigte, dass die Mutante p.Asp235Tyr eine extrem verminderte bzw. keine Aktivität besaß. Da nach sechszig Minuten kein proteolytischer Abbau feststellbar war, konnte die proteolytische Aktivität als 0 % definiert werden.

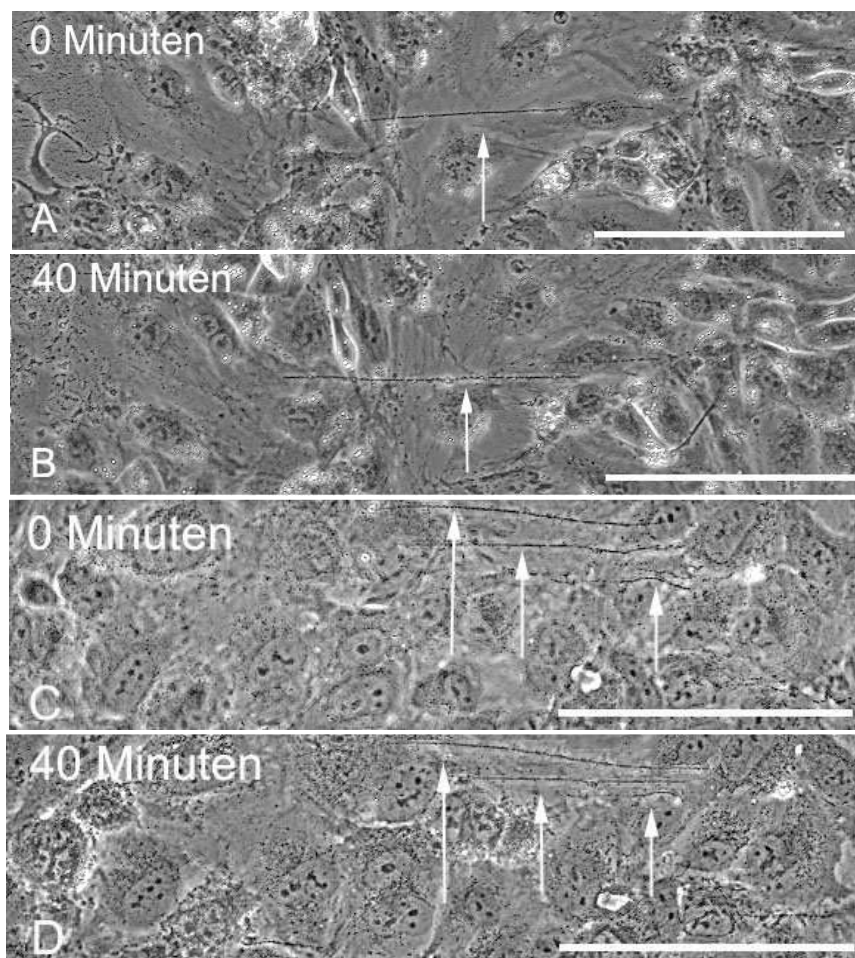


Abbildung 29: Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr. Der mikrofluidische Assay wurde nach der in Abschnitt 2.2.7. beschriebenen Methode durchgeführt. In (A) und (C) werden die VWF-Fäden durch weiße Pfeile vor Zugabe von p.Asp235Tyr markiert. In (B) und (D) wird dieselbe Stelle vierzig Minuten nach Zugabe von p.Asp235Tyr gezeigt. Unter Fluss verlagern sich die HUVEC-Zellen, sodass ihre Position sich an derselben Stelle im Flusskanal verschieben kann. Nach Ausbildung von VWF-Fäden durch Histamin-Stimulation der HUVEC-Zellen wurde ein 20-faches Konzentrat von p.Asp235Tyr zugegeben. Die VWF-Fäden wurden durch den GP-Ib-Latexkugeln-Komplex sichtbar und der proteolytische Abbau der VWF-Fäden wurde direkt bei 40-facher Vergrößerung im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) beobachtet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Zur Darstellung der nicht proteolysierten VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr und des GP-Ib-Latexkugeln-Komplexes wurde auch hier die Immunfluoreszenzfärbung

Kristina Kraus

eingesetzt (**Abbildung 30 A-D**). Die Markierung der VWF-Fäden und der mit VWF-angereicherten Weibel-Palade-Körperchen mit dem grün-fluoreszierenden Antikörper wurden im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) fotografiert (**Abbildung 30 B**). Auch die Anfärbung des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes wurde im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) festgehalten (**Abbildung 30 C**). In der Überlagerung war die Anlagerung der VWF-Fäden und des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes in einem gelblich-orangen Ton zu sehen (**Abbildung 30 D**). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die nicht einsetzende Proteolysierung der VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr bestätigt.

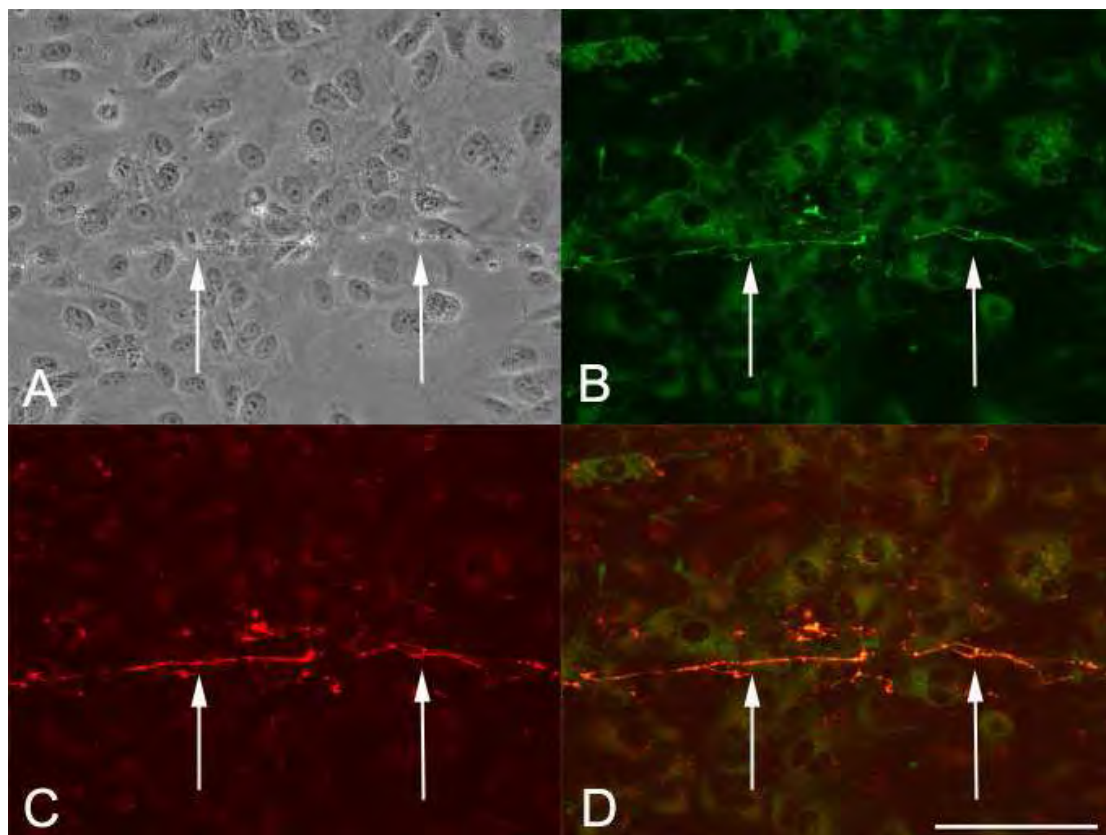


Abbildung 30: Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde direkt nach Durchführung des mikrofluidischen Assays realisiert. Hierfür wurden die HUVEC-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. (A) zeigt ein Durchlichtbild eines Sichtfeldes im Flusskanal. (B) zeigt VWF, der mit einem primären rabbit anti-VWF Antikörper (1:1000, Dako) und dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:5000, Invitrogen) im GFP-Filter (grün) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert werden. In (C) wurde der Komplex aus GP-Ib α -Peptid und dem monoklonaler anti-GP-Ib-Peptid-Antikörper auf der Oberfläche der Latexkügelchen mittels eines Alexa Fluor 546 gekoppelten anti-mouse Antikörpers (1:5000, Invitrogen) im TRITC-Filter (rot) des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence) detektiert. Das Übereinanderlegen der Bilder, die im GFP- (grün) und TRITC-Filter (rot) erstellt wurden, ergab (D). Der Maßstab beträgt 100 μ m.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zentralen Fragestellung, inwiefern TTP-assoziierte Mutationen innerhalb verschiedener ADAMTS13-Domänen unter physiologischen Bedingungen Einfluss auf die Bindung von ADAMTS13 an VWF und die anschließende proteolytische Spaltung von VWF haben. Dabei sollte untersucht werden, ob zwischen scherabhängigen und scherunabhängigen Defekten unterschieden werden kann.

Das Upshaw-Schulman-Syndrom ist die hereditäre Form der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura, einer lebensbedrohenden Erkrankung, die für die Patienten ohne Plasmatherapie letal enden kann. Das Spektrum der Symptome ist sehr breit. Die Krankheit wird durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und mikrovaskuläre Thrombosen mit verheerenden Konsequenzen gekennzeichnet (Furlan, Lämmle, 2001, Sadler, 2002, Tsai, 2003)². Die Aktivität von ADAMTS13 in TTP-Patienten liegt unter fünf Prozent der Aktivität im Normalplasma und es kommt zur Akkumulation von hyperadhäsiven UL-VWF-Multimeren (Bianchi et al., 2002).

Die Verminderung der Aktivität bei der erworbenen Form der TTP wird durch Autoimmunantikörper verursacht, während für den Ausbruch der hereditären Form der TTP (USS) Mutationen im ADAMTS13-Gen verantwortlich sind. Diese können auf verschiedene Weise dazu führen, dass die proteolytische Aktivität im Plasma erniedrigt ist. Beispielsweise kann eine Mutation im katalytischen Zentrum zur Inaktivierung des Enzyms führen (Uchida et al., 2004). Auch sind Mutationen bekannt, die die Sekretion von ADAMTS13 verhindern, wodurch zu wenig ADAMTS13 in das Plasma gelangt (Peyvandi et al., 2006).

Aktuelle diagnostische Tests zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 sind kommerziell erhältliche, statische und unphysiologische Assays, die eine verminderte proteolytische Spaltung bestimmen können, aber keine Aussage über die Ursache liefern. Beispielsweise berichten Peyvandi et al. über zahlreiche Assays, die seit dem Jahre 1998 entwickelt wurden (Peyvandi et al., 2010). In diesen Assays wird die Aktivität von ADAMTS13 über die Proteolyse von verschiedenen VWF-Substraten detektiert. Bei den Substraten kann es sich dabei um VWF-Multimere aus dem Plasma, rekombinante VWF-Multimere oder synthetisch hergestellte VWF-Peptide handeln. Eingesetzte Methoden sind häufig die

Elektrophorese, Techniken zur Bestimmung der Plättchenaggregation, der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und Immunassays wie beispielsweise der ELISA. Die Assays zur Detektion von gespaltenen VWF-Multimeren weisen eine hohe Sensitivität von drei bis sechs Prozent der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 auf. Die Nachteile sind eine schwierige Reproduzierbarkeit in herkömmlichen Laboratorien, sowie die zeitaufwendige, zwei bis drei-tägige Durchführung und die Umsetzung unter unphysiologischen Bedingungen mit denaturierenden Agentien wie 1,5 M Urea oder 1,5 M Guanidin-Salzsäure. Die denaturierenden Agentien erlauben die Zugänglichkeit der A2-Domäne von VWF-Multimeren für ADAMTS13 ohne den Einsatz von Scherkräften. Die Assays, die die Spaltung von VWF-Peptiden detektieren, besitzen eine sehr hohe Sensitivität von ein bis drei Prozent der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 und sind leicht reproduzierbar. Zusätzlich werden sie ohne denaturierende Agentien durchgeführt. Einziger Nachteil besteht in der Nutzung von unphysiologischen VWF-Substraten (Peyvandi et al., 2010).

Alle bisher eingesetzten Assays zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 arbeiten damit bei statischen Bedingungen und simulieren nicht die *in vivo* vorliegenden physiologischen Bedingungen zur Entfaltung der VWF-Multimere und dem damit verbundenen enzymatischen Abbau durch ADAMTS13. Zusätzlich kann der Einsatz von denaturierenden Agentien die proteolytische Aktivität von ADAMTS13 beeinträchtigen und zu falschen Resultaten führen (Peyvandi et al., 2010). Beeinträchtigt aber eine Mutation beispielsweise die scherabhängige Bindung von ADAMTS13 an VWF, so wäre es möglich, dass sie im statischen Assay normale Aktivität zeigt, obwohl sie in der Zirkulation unfähig ist zu binden und damit dort eine reduzierte Aktivität besäße. Um solche Effekte untersuchen zu können, wäre die Applikation von Scherstress bei der Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität wichtig. Schließlich widerlegte Dong die Aussage, dass globulärer ungestreckter Plasma-VWF das natürliche Substrat für ADAMTS13 ist und zeigte, dass durch Scherstress gestreckte UL-VWF-Multimere, die an der Oberfläche von Endothelzellen verankert sind, das eigentliche Substrat für ADAMTS13 sind. Globulärer Plasma-VWF zirkuliert, wie auch ADAMTS13, im Plasma und setzt sich aus unterschiedlichen VWF-Multimergrößen zusammen, die durch das Schneiden von VWF-Fäden durch ADAMTS13 entstehen. Sie schlussfolgerten, dass UL-VWF das natürliche Substrat von ADAMTS13 sein muss, weil dieser ohne proteolytischen Abbau eine hyperaktive Bindung an den GP-Ib/-IX/-V-Komplex auf der Plasmamembran von Plättchen

aufweist. Bei Nicht-Regulierung durch ADAMTS13 würde UL-VWF nicht geschnitten werden, sodass sich UL-VWF-Multimere an Plättchen anlagern würden und es zur übermäßigen VWF-Plättchen-Aggregation resultierend in der Erkrankung TTP kommen könnte (Dong, 2005). Bereits 1988 zeigten Moake et al., dass fluidischer Scherstress zur Erhöhung der Bindungsaffinität von VWF an Plättchen beiträgt und somit die Plättchenaggregation und Thrombenbildung beschleunigt (Moake et al., 1988). Bei Applikation von Scherstress werden UL-VWF-Moleküle ohne den Einsatz von denaturierenden Agentien gestreckt und es kommt zur Entfaltung der A1- bis A3-Domänen (Dong et al., 2002, Dong et al., 2004). Der proteolytische Abbau von UL-VWF ist bei genügend hohem Scherstress unter fluidischen physiologischen Bedingungen um das 1000-fache schneller als unter statischen unphysiologischen Bedingungen (Dong et al., 2002). Zur Proteolyse von zirkulierendem, globulärem Plasma-VWF benötigt ADAMTS13 einen arteriellen Scherstress von 34 bis 48 dyn/cm^2 , während die Proteolyse von gestreckten UL-VWF-Fäden bei einem arteriellen Scherstress von 40 dyn/cm^2 und bei einem venösen Scherstress von 2,5 dyn/cm^2 mit gleicher Effizienz erfolgt (Banno et al., 2006).

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein mikrofluidischer Assay zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13-Mutanten verwendet, der in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert wurde. Dieser Assay, der es erlaubt den Abbau von VWF-Fäden unter physiologischen Scherbedingungen zu beobachten, wurde hier weiterführend optimiert. Um sichtbare VWF-Fäden als Substrat für ADAMTS13 zur Verfügung zu stellen, wurden HUVEC-Zellen mit Histamin stimuliert. Unter konstantem, unidirektionalem und laminarem Fluss bildeten sich bei einem Scherstress von 5 dyn/cm^2 innerhalb von einer Minute VWF-Fäden aus, die mittels eines GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurde durch die Immunfluoreszenzfärbung die Kolokalisation des VWFs und des GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes gezeigt. Es lässt sich somit feststellen, dass mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung der Nachweis erbracht werden konnte, dass die im Durchlicht beobachteten Fäden tatsächlich aus VWF und dem GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex bestanden. Die beobachteten VWF-Fäden wiesen Längen von 10 μm bis 1 mm auf. Im Vergleich dazu wurden in der Literatur mittels Plättchen visualisierte VWF-Fäden in einer Länge von 1 μm bis 3 mm beschrieben (Dong, 2005). Dass sich unter Einsatz von Plättchen zur Visualisierung von VWF-Fäden

längere Fäden nachweisen lassen, liegt wahrscheinlich daran, dass Pättchen über ihre GP-IIb/-IIIa-Rezeptoren zur Quervernetzung von VWF führen und damit längere quervernetzte Fäden entstehen. In dem hier genutzten Assay wurden Plättchen durch den GP-Ib-Latexkügelchen-Komplex simuliert, der nur das GP-Ib-Bindungspeptid besitzt und damit vermutlich keine Quervernetzung erzeugen kann.

Die visualisierten VWF-Fäden wurden anschließend als Substrat für rekombinante wtADAMTS13-Proteine eingesetzt. Wie in Abschnitt 3.3. gezeigt, konnte dadurch bestätigt werden, dass sich der mikrofluidische Assay zur Beobachtung der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 unter Flussbedingungen eignet. Als Referenzwert für die nachfolgenden Untersuchungen von ADAMTS13-Mutanten wurde der vollständige Abbau aller VWF-Fäden durch 100 ng/ml rekombinantes wtADAMTS13 innerhalb von drei Minuten als 100 % proteolytische Aktivität definiert. Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde bestätigt, dass die VWF-Fäden innerhalb von drei Minuten vollständig durch wtADAMTS13 abgebaut wurden.

4.1. Herstellung von rekombinanten ADAMTS13-Mutanten

Wie in Abschnitt 1.3. beschrieben, erfolgt die proteolytische Spaltung von VWF durch ADAMTS13 nach einem mehrstufigen Mechanismus, der aus scherunabhängigen und scherabhängigen Bindungsschritten mit anschließender Spaltung der Bindung Tyr1605-Met1606 besteht (Crawley et al., 2011). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, welchen dieser Schritte Mutationen beeinflussen, die in Patienten mit hereditärer TTP (USS) identifiziert wurden. Hierfür wurden alle zu untersuchenden ADAMTS13-Mutanten in ausreichender Konzentration rekombinant in HEK-293-EBNA-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse des Western Blots zeigten, dass die Expression in den HEK-293-EBNA-Zellen erfolgreich war. Dabei wurde im Zelllysats für jedes exprimierte Protein eine Bande bei ungefähr 180 kDa detektiert, während im Medium mehrere Banden zu erkennen waren. Die beiden unteren Banden im Medium wurden bei ungefähr 160-180 kDa detektiert, sodass dieses Ergebnis mit der Angabe aus der Literatur für die Größe von ADAMTS13 übereinstimmt (Crawley et al., 2011). Zusätzlich wurde im Medium eine Bande bei ungefähr 220 kDa detektiert. Diese größere ADAMTS13-Variante deutete auf Glykosylierung und posttranslationale Modifikationen hin. Glykosylierung führt dazu, dass Proteine langsamer im SDS-Gel wandern und auf höheren Molekulargewichten

detektiert werden. In der Literatur wird der Glykosylierungsprozess von ADAMTS13 bestätigt und es wird darauf verwiesen, dass ADAMTS13 zehn N-glykosylierbare Sequenzen innerhalb der Metalloprotease-Domäne, der Spacer-Domäne, der TSP1-4-Region und den CUB-Domänen besitzt. Zusätzlich besitzt ADAMTS13 O-fucosylierte Sequenzen in mindestens sechs TSP1-Regionen. Der Begriff der O-Fucosylierung meint einen Glykosylierungsprozess, der die Addition von Fucose an das Molekül beschreibt und der notwendig für die Sekretion der Protease ist (Ricketts et al., 2007).

Beim Glykosylierungsprozesse muss beachtet werden, dass dieser unabdingbar für eine effiziente Sekretion ist. Dementsprechend war die detektierte obere Medium-Bande, die auf Glykosylierung hindeutete, ein erwartetes Ergebnis. Jede N-glykosylierte Sequenz hat Auswirkungen auf die Sekretion (Zhou, Tsai, 2009). Die Glykosylierung führt zusätzlich zur korrekten Faltung von ADAMTS13, zur Ausbildung von Disulfidbindungen und weiteren wichtigen Prozessierungsschritten im endoplasmatischen Retikulum der Protease. Neueste Studien haben sogar gezeigt, dass die hereditäre Form der TTP in Verbindung mit einer beeinträchtigten Sekretion steht. Dabei werden die Mutanten der Protease in Zellkompartimenten retardiert (Kokame et al., 2002, Pimanda et al., 2004, Donadelli et al., 2006, Hommais et al., 2007).

Für die weiteren Schlussfolgerungen gilt, dass das einzusetzende Volumen der jeweiligen TTP-assoziierten Mutanten für den Flussassay unter Berücksichtigung der Western Blot- und ELISA-Daten angepasst wurde.

4.2. Einfluss von Mutationen der CUB1-Domäne von ADAMTS13 auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden

Es wurden zwei ADAMTS13-Mutanten untersucht, die die Mutationen Arg1219Trp bzw. Gly1239Val in der CUB1-Domäne tragen. Bei der Mutation Arg1219Trp handelt es sich um die Änderung der basischen Aminosäure Arginin zu der polaren Aminosäure Tryptophan an der Position 1219, die auf der Nukleotidsubstitution 3655C>T im Exon 26 beruht (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). Die zweite getestete Mutante, deren Mutation auf der Änderung der unpolaren Aminosäure Glycin zu der ebenfalls unpolaren Aminosäure Valin an der Position 1239 beruht, ist bedingt durch die Nukleotidsubstitution 3716G>T im Exon 27 (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser).

Für beide Mutanten wurde eine mit wtADAMTS13 vergleichbare proteolytische Aktivität festgestellt. Trotz der Tatsache, dass die Mutanten p.Arg1219Trp bzw. p.Gly1239Val in einer geringeren Konzentration im mikrofluidischen Assay getestet wurden als wtADAMTS13, zeigten diese keine reduzierte proteolytische Aktivität. Die Sekretion für p.Arg1219Trp lag bei 20 % und für p.Gly1239Val bei 40 %.

In vorherigen Studien wurde die Signifikanz der CUB-Domänen bei der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 häufig anhand von statischen denaturierenden Assays diskutiert und teilweise sind widersprüchliche Aussagen getroffen worden. Majerus et al. wiesen mithilfe eines ELISA-Bindungsassays nach, dass die CUB-Domänen wichtige Funktionen bei der Bindung von ADAMTS13 an immobilisiertes VWF erfüllen und an der Interaktion von ADAMTS13 mit VWF beteiligt sind. Sie verwendeten ein statisches Assay, bei dem VWF an eine Plastikoberfläche immobilisiert war (Majerus et al., 2005). Dagegen zeigten Ai et al., dass die CUB-Domänen *in vitro* für die Erkennung von Plasma-VWF oder einem VWF-Peptid, bestehend aus den 73 Aminosäuren Asp1595-Arg1668, durch ADAMTS13 nicht erforderlich sind (Ai et al., 2005). Drei weitere Studien bestätigten die Ergebnisse von Ai et al. und verdeutlichten, dass die CUB-Domänen die proteolytische Aktivität unter statischen Voraussetzungen *in vitro* nicht beeinflussen (Soejima et al., 2003, Zheng et al., 2003, Banno et al., 2004).

Werden diese Ergebnisse aus den statischen Assays mit denen im Rahmen dieser Thematik herausgearbeiteten Resultaten verglichen, so wird deutlich, dass die Mutationen Arg1219Trp bzw. Gly1239Val der CUB1-Domäne unter physiologischen Scherbedingungen keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität haben, und sich somit mit den Ergebnissen aus den statischen Assays von Ai et al. decken. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass Ai et al. die Proteolyse von VWF durch ADAMTS13 an einem verkürzten und modifizierten VWF-Konstrukt testeten und dies eventuell (evtl.) zu der Schlussfolgerung führte, dass die CUB-Domänen nicht signifikant bei der VWF-Spaltung sind. Crawley et al. beschrieben den Mechanismus der Proteolyse von im Plasma zirkulierendem UL-VWF und erläuterten, inwiefern CUB-Domänen an der Erkennung und Interaktion von globulärem nicht gestrecktem UL-VWF beteiligt sind (Crawley et al., 2011). In dem hier eingesetzten mikrofluidischen Assay wurde die proteolytische Aktivität von Mutanten mit Mutationen in der CUB1-Domäne an bereits gestrecktem UL-VWF getestet, der nach

Stimulation an der Oberfläche von Endothelzellen verankert vorlag. Dass die beiden untersuchten Mutanten an dieses gestreckte Substrat banden und es mit normaler Aktivität spalten konnten, bestätigt die Beobachtungen von Crawley et al. Demnach wird die verminderte Spaltung von VWF in USS-Patienten also über einen anderen Mechanismus verursacht: Bei den hier untersuchten Mutanten wurde keine reduzierte proteolytische Aktivität beobachtet, dafür aber eine verminderte Sekretion festgestellt. Im Vergleich zu wtADAMTS13 wurde die Mutante p.Arg1219Trp nur zu 20 % und p.Gly1239Val zu 40 % aus HEK-293-EBNA-Zellen sekretiert. Folglich beeinflussen diese Mutationen die Sekretionseffizienz von ADAMTS13 und können dadurch zur Auslösung der hereditären Erkrankung führen. In einer Studie von Peyvandi et al. werden diese Ergebnisse bestätigt (Peyvandi et al., 2006). Sie beobachteten nämlich eine defekte Sekretion der Mutante p.Arg1239Trp und eine damit einhergehende intrazelluläre Akkumulation der Protease im ER (Peyvandi et al., 2006).

4.3. Einfluss von Mutationen der TSP1-1-2-Regionen von ADAMTS13 auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden

Zur Untersuchung des Einflusses der TSP1-1-2-Regionen wurden die Mutanten p.Cys400Arg und p.Gly702Arg getestet. p.Gly702Arg besitzt die *Missense*-Mutation 2104G>C im Exon 17, die zu einer Änderung der unpolaren Aminosäure Glycin zu der basischen Aminosäure Arginin an der Position 702 in der TSP1-2-Region führt (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). Für diese Mutation wurde im mikrofluidischen Assay unter Einbeziehung der Konzentration, im Vergleich zu wtADAMTS13, keine reduzierte proteolytische Aktivität festgestellt. Es konnte lediglich eine um 80 % reduzierte Sekretion im Vergleich zu wtADAMTS13 beobachtet werden.

In der Literatur sind widersprüchliche Aussagen bezüglich der Funktionalität der TSP1-2-8-Regionen zu finden. Ai et al. zeigten, dass die TSP1-2-8-Regionen nicht an der Substratspezifität und proteolytischen Aktivität *in vitro* beteiligt sind (Ai et al., 2005). Zweit weitere Studien bestätigten dies und beobachteten, dass unter statischen Voraussetzungen die TSP1-2-8-Regionen nicht relevant für die Substraterkennung sind (Soejima et al., 2003, Zheng et al., 2003). Zanardelli et al. wiesen nach, dass nur die TSP1-5-8-Regionen oder die CUB-Domänen unter statischen Voraussetzungen wichtig für die Substraterkennung durch ADAMTS13

sind (Zanardelli et al., 2009). Zur Analyse nutzten sie die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie sowie ein Plättchenbindungsassay. Sie arbeiteten mit modifizierten ADAMTS13-Konstrukten bestehend aus den Aminosäuren 34-685 und den Aminosäuren 34-894 (Zanardelli et al., 2009).

Unter Flussbedingungen ist die Substraterkennung durch die TSP1-2-8-Regionen jedoch kritischer zu betrachten. Beispielsweise wurde eine hyperaktive Proteolyse von UL-VWF durch ein Konstrukt von ADAMTS13 festgestellt, das nach der Spacer-Domäne an der Position Ala685 trunziert war (Zheng et al., 2003, Tao et al., 2005¹). Dies lässt vermuten, dass die TSP1-2-8-Regionen zusammen mit den CUB-Domänen an der Inhibition der Spaltung von UL-VWF beteiligt sind (Tao et al., 2005)¹. Weiterhin wurde gezeigt, dass synthetische Peptide oder rekombinante Fragmente der TSP1-2-8-Regionen und der CUB-Domänen die Spaltung der VWF-Multimere, die an Endothelzelloberflächen haften, unter fluidischen Bedingungen blockieren (Tao et al., 2005)². Crawley et al. stellten dar, dass die TSP1-2-8-Regionen zusammen mit den CUB-Domänen wichtig für die Erkennung und Interaktion mit globulärem UL-VWF sind (Crawley et al., 2011).

Vor diesem Hintergrund ist die Schlussfolgerung sinnvoll, dass in dem hier eingesetzten Assay die Mutation der unpolaren Aminosäure Glycin zu der basischen Aminosäure Arginin an der Position 702 nicht mit den Ergebnissen aus den hier erwähnten statischen und fluidischen Analysen verglichen werden kann. Es wurden verkürzte bzw. modifizierte VWF-Konstrukte als Substrat für ADAMTS13 eingesetzt (Ai et al., 2005). Zum Beispiel wurden globulärer ungestreckter VWF (Crawley et al., 2011), nach der Spacer-Domäne trunzierte ADAMTS13-Mutanten, nicht vergleichbare Mutanten (Zheng et al., 2003, Tao et al., 2005¹, Zanardelli et al., 2009) oder synthetische Peptide sowie rekombinante Fragmente der TSP1-2-8-Regionen verwendet (Tao et al., 2005)². Die Mutation Gly702Arg befindet sich in unmittelbarer Nähe einer putativen N-Glykosylierungsstelle (707AsnTyrSerCys). Daher ist anzunehmen, dass die Mutante p.Gly702Arg nicht die proteolytische Aktivität beeinflusst, dafür aber zu einer beeinträchtigten Sekretion führt. Möglicherweise wird durch die Änderung der unpolaren Aminosäure Glycin zu der basischen Aminosäure Arginin die Glykosylierung an Asn707 verhindert. Dies könnte zur Retention der Mutante im ER führen, wodurch die an sich proteolytisch voll aktive Mutante den VWF im Plasma nicht erreichen kann und somit in Patienten zu hereditärer TTP führt.

Bei der Mutation Cys400Arg handelt es sich um den Basenaustausch 1198T>C im Exon 10, der die Änderung der polaren Aminosäure Cystein zur basischen Aminosäure Arginin in der TSP1-1-Region verursacht (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). Im mikrofluidischen Assay wurde eine proteolytische Aktivität in Relation zu wtADAMTS13 von 50 % und eine Sekretion von 20 % festgestellt.

Ai et al. zeigten, dass die TSP1-1-Region zusammen mit der Disintegrin-Domäne, der Cystein-reichen Domäne und der Spacer-Domäne an der Substratspezifität, Erkennung und Spaltung des VWFs zwischen den Aminosäuren Asp1595-Arg1668 beteiligt ist (Ai et al., 2005). Die hier beschriebene um 50% reduzierte proteolytische Aktivität von p.Cys400Arg bestätigte diese Daten. Offenbar beeinflusst die Mutation einer polaren Aminosäure zu einer basischen Aminosäure an der Position 400 die Proteolyse der VWF-Fäden und zusätzlich die Sekretionsrate, wodurch die Aktivität in USS-Patienten so stark beeinträchtigt wird, dass auf einen zusätzlichen Auslöser hin die Aktivität unter fünf Prozent sinkt.

4.4. Einfluss einer Mutation der Spacer-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden

Die Mutante p.Pro671Leu weist die Nukleotidsubstitution 2012C>T im Exon 17 auf. Bei der Mutation Pro671Leu handelt es sich um die Änderung der unpolaren Aminosäure Prolin zu der unpolaren Aminosäure Leucin an der Position 671 (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). Die Analyse des proteolytischen Abbaus im mikrofluidischen Assay zeigte eine proteolytische Aktivität von 33 % und eine Sekretion von 45 % im Vergleich zu wtADAMTS13.

In einer Studie von Soejima et al. wurde dargestellt, dass die Spacer-Domäne zusammen mit der Cystein-reichen Domäne als Erkennungs- und Bindungssequenz für UL-VWF fungiert (Soejima et al., 2003). Auch Crawley et al. bestätigten die Signifikanz der Spacer-Domäne und argumentierten damit, dass sie notwendig für eine effektive Proteolyse von kurzen VWF-Fragmenten (bestehend 73 oder 115 Aminosäuren) ist. Durch die Spacer-Domäne wird eine komplementäre Sequenz in entfaltetem VWF gebunden. Dabei spielen vor allem die Aminosäuren Arg660, Tyr661 und Tyr665 in der Spacer-Domäne von ADAMTS13 eine wichtige Rolle, die an die Aminosäuren Glu1660 und Arg1668 der A2-Domäne des VWFs binden (Crawley et al., 2011). Ohne den Einfluss der Spacer-Domäne kann sich die

proteolytische Aktivität um das 20-fache reduzieren (Gao et al., 2006). In der jüngsten Vergangenheit konnte sogar gezeigt werden, dass Trunkierungen sowohl nach der Cystein-reichen Domäne als auch innerhalb der Spacer-Domäne zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität von ADAMTS13 führen (Kokame et al., 2002, Zheng et al., 2003).

Die Resultate dieser Studien konnten hier bestätigt werden. Die Mutation Pro671Leu befindet sich in direkter Nähe zu den Aminosäuren Arg660, Tyr661 und Tyr665, die für die Bindung von ADAMTS13 an die A2-Domäne des VWFs erforderlich sind. Eine Mutation der unpolaren Aminosäure Prolin zu der unpolaren Aminosäure Leucin, angrenzend an die Aminosäuren Arg660, Tyr661 und Tyr665, scheint erheblichen Einfluss auf die proteolytische Aktivität und Sekretion von ADAMTS13 zu besitzen. Offenbar ist Prolin wichtig für eine korrekte Sekundärstruktur. Wird das Prolin durch eine andere Aminosäure ersetzt, wird vermutlich die Sekundärstruktur so verändert, dass die drei benachbarten Aminosäuren Arg660, Tyr661 und Tyr665 nicht mehr optimal an VWF binden können.

4.5. Einfluss einer Mutation der Disintegrin-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden

Für die Mutante p.Pro353Leu, die durch die Nukleotidsubstitution 1058C>T im Exon 9 entsteht (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser), wurde eine proteolytische Aktivität von 29 % und eine Sekretion von 45 % in Abstimmung mit dem Ergebnis für wtADAMTS13 gezeigt. Die *Missense*-Mutation ist durch die Aminosäureänderung an der Position 353 von der unpolaren Aminosäure Prolin zu der unpolaren Aminosäure Leucin charakterisiert (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). Sie befindet sich in direkter Nähe zu den Aminosäuren Arg349Cys, Leu350 und Val352, die als Hilfssequenzen bei der Bindung von ADAMTS13 an die A2-Domäne des VWFs dienen und zur Ausrichtung der Metalloprotease-Domäne zur Schnittstelle Tyr1605-Met1606 des VWFs führen (Crawley et al., 2011). de Groot et al. bestätigten die essentielle Funktion der Disintegrin-Domäne für die enzymatische Aktivität von ADAMTS13 und Substratspezifität (de Groot et al., 2009). Mutationen an den Positionen 349 sowie 350 reduzieren die proteolytische Spaltung von VWF-Peptiden, bestehend aus 115 Aminosäuren, um das 10- bis 20-fache (de Groot et al., 2009). Ai et al. untersuchten das Zusammenwirken der Disintegrin-Domäne, der TSP1-1-Region, der Cystein-

reichen Domäne und der Spacer-Domäne *in vitro* und stellten fest, dass diese Domänen essentiell für die Substratspezifität und Spaltung des VWFs sind (Ai et al., 2005).

Die Resultate der zitierten Studien konnten hier bestätigt werden und verdeutlichen die hohe Relevanz der Disintegrin-Domäne für die proteolytische Spaltung von VWF durch ADAMTS13. Eine Mutation an der Position 353, die durch das Fehlen von Prolin charakterisiert ist, reduziert die proteolytische Aktivität und die Sekretion von ADAMTS13 erheblich und führt vermutlich zu Störungen in der Sekundärstruktur von ADAMTS13.

4.6. Einfluss einer Mutation der Metalloprotease-Domäne auf den proteolytischen Abbau von VWF-Fäden

Abschließend wurde die Mutante p.Asp235Tyr im mikrofluidischen Assay getestet. Die Mutation Asp235Tyr ist durch die Änderung der sauren Aminosäure Aspartat zu der polaren Aminosäure Tyrosin gekennzeichnet. Diese Mutation entsteht durch die Nukleotidsubstitution 705G>T im Exon 7 (persönliche Mitteilung von W. Hassenpflug und T. Obser). p.Asp235Tyr zeigte im mikrofluidischen Assay keine bestimmbare proteolytische Aktivität und die Sekretion lag bei 20 % im Vergleich zu wtADAMTS13. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 15 *Missense*-Mutationen der Metalloprotease-Domäne bekannt, davon sind neun Mutationen in Expressionsstudien bereits charakterisiert worden (Kokame, Miyata, 2004, Uchida et al., 2004). Die meisten Mutationen führen zu Änderungen des Sekretionswegs und sind durch eine verminderte oder keine enzymatische Aktivität gekennzeichnet. Auch ist häufig keine proteolytische Aktivität aufgrund der Abwesenheit oder Änderungen von Zink-Bindungssequenzen festzustellen (Uchida et al., 2004). Dies konnte auch hier im mikrofluidischen Assay für die Mutation Asp235Tyr beobachtet werden. Offenbar führt eine Mutation der sauren Aminosäure Aspartat zu der polaren Aminosäure Tyrosin an der Position 235 zur Inaktivierung von ADAMTS13. Für eine proteolytische Aktivität benötigt ADAMTS13 die zweiwertigen Kationen Zink und Calcium. Das Zinkion wird im katalytischen Zentrum von ADAMTS13 durch die drei konservierten Histidine His224, His228 und His234, sowie die Aminosäure Glu225 koordiniert (Crawley et al., 2011). Die Mutation Asp235Tyr führt zum Ersetzen der sauren Aminosäure Aspartat, die vermutlich die Ausrichtung der Aminosäure His234 durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren kann. Die unpolare Aminosäure

Tyrosin besitzt einen aromatischen Ring, der keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, sondern nur über die schwachen Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Ringsystem des Histidins interagieren kann. Folglich besteht die Möglichkeit, dass Strukturänderung bewirkt wird, die dazu führt, dass das Zink nicht mehr gebunden wird und keine proteolytische Aktivität mehr besteht.

Auch muss in Betracht gezogen werden, dass die Mutation Asp235Tyr sich in räumlicher Nähe zur Aminosäure Leu232 befindet. Crawley et al. stellten fest, dass die N-terminalen Aminosäuren Leu198, Leu232 und Leu274 in der Metalloprotease-Domäne an die Aminosäuren Leu1603 und Val1604 in der A2-Domäne des VWFs binden und dazu führen, dass die Aminosäuren Leu151, Val195 und Asp252-Pro256 von ADAMTS13 die proteolytische Spaltung zwischen Tyr1605 und Met1606 von VWF verursachen (Crawley et al., 2011). Aufgrund der Tatsache, dass die Mutation Asp235Tyr sich in der Nähe zur Aminosäure Leu232 befindet, ist es naheliegend, dass durch diese Mutation die Substrat-Bindung der katalytischen ADAMTS13-Domäne gehemmt werden könnte und die proteolytische Aktivität daher bei 0 % liegt.

4.7. Identifizierung scherabhängiger Störungen der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie Mutationen in verschiedenen ADAMTS13-Domänen die proteolytische ADAMTS13-Aktivität unter Scherbedingungen beeinflussen. Hierbei konnte eine tendenzielle Abnahme der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13 in Abhängigkeit der Position der Mutation im ADAMTS13-Protein festgestellt werden. Mutationen, die sich in der Nähe des N-terminalen Endes und des katalytischen Zentrums befinden und die scherabhängige Bindung vermitteln, besitzen einen höheren Einfluss auf die proteolytische Aktivität von ADAMTS13 als Mutationen, die eher am C-Terminus lokalisiert sind (**Abbildung 31**).

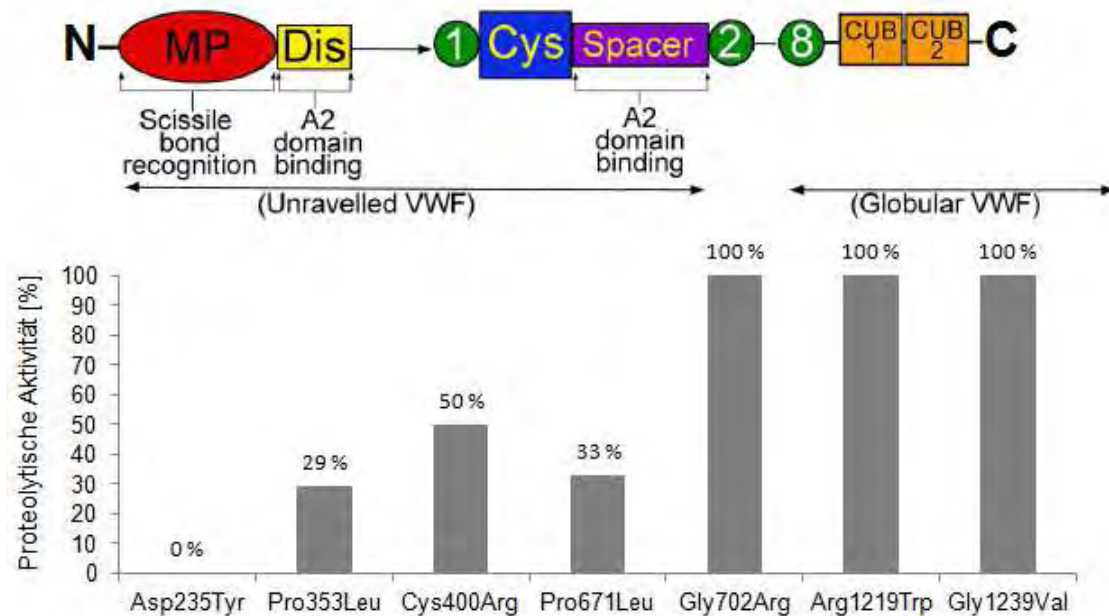


Abb. 31: Scherabhängige Dysfunktion von ADAMTS13-Mutanten. Am N-terminalen Ende befinden sich die Metalloprotease-Domäne, die Disintegrin-Domäne, die TSP1-1-Region sowie die Cysteine-reiche Region und die Spacer-Domäne. Die N-terminalen Mutanten p.Asp235Tyr, p.Pro353Leu, p.Cys400Arg und p.Pro671Leu zeigten eine reduzierte proteolytische Aktivität in Abhängigkeit des Schers. Am C-terminalen Ende befinden sich die TSP1-2-8-Regionen und die CUB-Domänen. Die C-terminalen Mutationen p.Gly702Arg, p.Arg1219Trp und p.Gly1239Val wiesen eine mit dem Wildtyp vergleichbare proteolytische Aktivität auf.

Schematische Darstellung von ADAMTS13 modifiziert nach: Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: *Blood*, 118: 3212-3221.

In einer Studie von Lotta et al. wurde dies bereits bestätigt. Mutationen der N-terminalen Domänen von ADAMTS13, die die scherabhängige Bindung beeinflussen, verursachen einen schwereren Grad der hereditären TTP und führen zu einem früheren Ausbruch als Mutationen der C-terminalen Domänen (Lotta et al., 2012). Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls von Crawley et al. in einer Studie aufgegriffen. Crawley et al. erläuterten den katalytischen Einfluss der Metalloprotease-Domäne von ADAMTS13 und die Spaltung der Schnittstelle Tyr1605-Met1606 am gestreckten UL-VWF (Crawley et al., 2011). Die TSP1-1-Region zusammen mit der Disintegrin-Domäne, der Cystein-reichen Domäne und der Spacer-Domäne sind für die Substratspezifität, Erkennung und Proteolyse des gestreckten VWFs notwendig (Ai et al., 2005). Die C-terminalen TSP1-2-8-Regionen und die CUB-Domänen sind lediglich an der Interaktion von ADAMTS13 mit dem globulären ungestreckten VWF beteiligt (Crawley et al., 2011). Diese Aussagen konnten in dem hier eingesetzten Assay für die getesteten Mutationen bestätigt werden. Unter Scherflussbedingungen zeigten lediglich die Mutationen der N-terminalen Domänen einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität. Mutationen in den C-terminalen Domänen hingegen

verminderten die proteolytische Aktivität nicht. Daher ist der im Rahmen der Thematik eingesetzte mikrofluidische Assay dazu geeignet, scherbedingte Fehlfunktionen zu diagnostizieren. Zukünftig könnte der hier eingesetzte Assay möglicherweise ein sehr hilfreiches diagnostisches Mittel darstellen, um beispielsweise Patienten zu erfassen. Patienten, deren ADAMTS13-Aktivität in den aktuellen statischen Tests normal erscheint und deren Beeinträchtigung eventuell nur unter Scherbedingungen zum Tragen kommt, könnten dadurch identifiziert werden. Um den Assay in der Diagnostik einsetzen zu können, sind aber noch einige Optimierungen nötig. Aufgrund der relativ aufwendigen Handhabung, die auf potenziellen Fehlern des Systems wie etwa Ventilprobleme, Luftbläschen in den Schläuchen und Kontaminationsschwierigkeiten beruht, ist die Nutzung des Assays für einen routinemäßigen Einsatz noch schwierig. Nach Überwinden dieser Komplikationen und der Etablierung einer standardisierten Kultivierung von Endothelzellen, könnte dieser Assay eine Bereicherung für Diagnostik und Forschung sein. Schließlich erlaubt dieser die Untersuchung von ADAMTS13 und VWF unter physiologischen Scherbedingungen, was zurzeit in der Diagnostik noch vollkommen ausgeschlossen ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass keine Plättchen zur Detektion der VWF-Fäden nötig sind, was eine aufwenige Plättchenisolierung und -Färbung, wie sie oft in der Forschung genutzt wird, überflüssig macht. Die kommerziell erhältlichen GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexe hingegen sind von gleichbleibender hoher Qualität, einfach in der Handhabung und ermöglichen die Untersuchung der GP-Ib-spezifischen Interaktion von VWF und Plättchen ohne Einfluss von GP-IIb/-IIIa. Daher könnte der Assay auch ein wertvolles Instrument zur Erforschung von VWF-Mutationen sein, die die Bindung und Vernetzung von Plättchen beeinträchtigen.

5. Zusammenfassung

Die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine erworbene oder hereditäre (auch Upshaw-Schulman-Syndrom (USS)) mikroangiopatische Erkrankung, die u. a. durch massive Bildung von Thromben, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und neurologische Ausfälle gekennzeichnet ist. Ein Defizit der Protease ADAMTS13 führt dazu, dass ultralange VWF-Multimere nicht mehr enzymatisch abgebaut werden und dadurch hyperadhäsive Fäden bilden, die zu thrombotischen Mikrozirkulationsstörungen führen (Peyvandi et al., 2006). In TTP-Patienten liegt die ADAMTS13-Aktivität unter fünf Prozent der Aktivität im Normalplasma (Bianchi et al., 2002). Aktuelle diagnostische Tests nutzen kommerziell erhältliche, statische und unphysiologische Assays für die Analyse der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 und ADAMTS13-Mutanten, die die physiologischen Bedingungen des enzymatischen Abbaus der UL-VWF-Multimere durch ADAMTS13 nicht korrekt simulieren. Da ADAMTS13 ein Enzym ist, dessen katalytische Aktivität ausschließlich durch Scherkräfte reguliert wird, werden Flussassays benötigt, um den katalytischen Mechanismus von ADAMTS13 besser erforschen zu können. Solche Flussassays nutzen VWF-Fäden als Substrat, die an der Oberfläche von Endothelzellen verankert sind und durch Plättchen visualisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay eingesetzt, der VWF-Fäden mittels eines GP-Ib-Latexkügelchen-Komplexes visualisiert. Diese Fäden wurden dann unter unidirektionalem, laminarem Fluss als Substrat für ADAMTS13-Mutanten genutzt, um den Einfluss von Mutationen in den einzelnen Domänen von ADAMTS13 auf die VWF-Spaltung unter physiologischen Scherbedingungen zu untersuchen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proteolytische Aktivität der untersuchten ADAMTS13-Mutanten mit Mutationen in den C-terminalen TSP1-2- und CUB1-Domänen (p.Gly702Arg, p.Arg1219Trp, p.Gly1239Val) nicht beeinflusst wurde. Für alle drei Mutanten wurde hingegen eine um 60 bis 80 %-ige Verringerung der Sekretion festgestellt. Dass diese drei Mutationen in USS-Patienten TTP-Symptome hervorrufen, liegt demnach nicht an einem Verlust der katalytischen Aktivität, sondern daran, dass die mutierte Protease das Plasma nicht erreichen kann. Dagegen beeinflussen die Mutationen Cys400Arg der TSP1-1-Region, Pro671Leu der Spacer-Domäne, Pro353Leu der Disintegrin-Domäne und Asp235Tyr der Metalloprotease-

Domäne sowohl die proteolytische Aktivität (p.Cys400Arg: 50 %, p.Pro671Leu: 33 %, p.Pro353Leu: 29 %, p.Asp235Tyr: 0%) als auch die Sekretion von ADAMTS13 (p.Cys400Arg: 20 %, p.Pro671Leu: 45 %, p.Pro353Leu: 45 %, p.Asp235Tyr: 20 %). Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher gezeigt werden, dass der genutzte Flussassay geeignet ist, um scherabhängige Fehlfunktionen von ADAMTS13 zu diagnostizieren. Dabei wurde für ADAMTS13-Varianten mit Mutationen in den N-terminalen Domänen eine Störung der Proteolyse gezeigt, die vermutlich auf einer reduzierten scherabhängigen VWF-Bindung beruht bzw. auf einer Inaktivierung des katalytischen Zentrums für die Mutante p.Asp235Tyr. Für Mutationen in den C-terminalen Domänen hingegen wurde keine Beeinträchtigung der VWF-Bindung und -Spaltung beobachtet. Der bereits beschriebene duale Bindungsmechanismus, der aus scherunabhängigen und scherabhängigen Schritten besteht (Crawley et al., 2011), konnte daher hier bestätigt werden. Diese Ergebnisse untermauern die Validität des Assays und verdeutlichen, dass dieser Assay die Möglichkeit für neue Untersuchungsansätze bietet. Ein denkbarer Ansatz wäre die Erfassung von USS-Formen, die mit statischen Assays bisher nicht erfasst werden konnten, da ihre Symptome scherabhängig auftreten.

Ziel weiterer Forschung wird es sein, die Handhabung des Assays für die Diagnostik zu optimieren, um die USS- und TTP-Diagnostik auf solche scherabhängigen Dysfunktionen zu erweitern und den zugrunde liegenden Mechanismus im Detail untersuchen zu können.

II. Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS13	<i>a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATIII	Antithrombin III
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CGLC	Cystein-Glycin-Leucin-Cystein
CK-Domäne	<i>cystein-knot-like domain</i>
cm ²	Quadratzenimeter
cDNS	<i>complementary-Desoxyribonukleinsäure</i>
Dis	Disintegrin-Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium</i>
evtl.	eventuell
ER	endoplasmatisches Retikulum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GP	Glykoprotein
G-Protein	Guaninnucleotid-bindende-Proteine
h	Stunde
HBRS	<i>Hepes buffered ringer solution</i>
HEK-293-EBNA	<i>Human embryonic kidney-293-Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
HMWK	<i>High-molecular-weight kininogen</i>
HUVEC-Zellen	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
kBp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml/kg	Milliliter pro Kilogramm
MP	Metalloprotease-Domäne
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PAI	Plasminogen-Inhibitor-Aktivator
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Prothrombinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
SP	Signalpeptid
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
tFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TTBS	<i>Tris-Buffered Saline , 0,05 % Tween-20</i>
TSP1-1	<i>first thrombospondin type-1</i>
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen/Minute
U/ml	units per milliliter
u-PA	urinärer Plasminogenaktivator
UL-VWF	ultralarge-VWF
USS	Upshaw-Schulman Syndrom
wt	Wildtyp
VWF	Von-Willebrand-Faktor
W	Tryptophan
WPK	Weibel-Palade-Körperchen
°C	Grad Celcius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
Ila	Thrombin
V	Proaccelerin

VII	Prokonvertin
VIII	Hämophilie-A-Faktor
IX	Hämophilie-B-Faktor
X	Stuart-Prower-Faktor
XI	Rosenthal-Faktor
XII	Hagemann-Faktor
XIII	fibrinstabilisierender Faktor

III. Drei-Buchstabencode

Ala	Alanin
Cys	Cystein
Asp	Aspartat
Glu	Glutamat
Phe	Phenylalanin
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Lys	Lysin
Leu	Leucin
Met	Methionin
Asn	Asparagin
Pro	Prolin
Gln	Glutamin
Arg	Arginin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Val	Valin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
---	Unbekannt oder nicht Standardamino­säure

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Thrombozytenadhäsion und -aggregation während der primären Hämostase.	4
Abbildung 2	Intrinsisches System der sekundären Hämostase.	5
Abbildung 3	Intrinsisches und extrinsisches System der sekundären Hämostase.	7
Abbildung 4	Fibrinolyse.	8
Abbildung 5	Die strukturellen und funktionellen Domänen des VWFs.	10
Abbildung 6	Verfeinerte VWF-Domänenstruktur	10
Abbildung 7	Biosynthese des VWFs.	12
Abbildung 8	Domänen der Protease ADAMTS13.	16
Abbildung 9.1	Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13.	18
Abbildung 9.2	Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13.	18
Abbildung 9.3	Mechanismus der Proteolyse von VWF durch ADAMTS13.	19
Abbildung 10	Nachweis von rekombinanten ADAMTS13-Varianten mittels Western Blotting.	37
Abbildung 11	Nachweis von rekombinanten ADAMTS13-Varianten mittels Western Blotting.	37
Abbildung 12	Wirkungsprinzip des Pumpsystems.	39
Abbildung 13	Mikrofluidischer Assay zur Visualisierung von VWF-Fäden.	41
Abbildung 14	Immunfluoreszenz von VWF-Fäden und GP-Ib-Latexkügelchen auf der Oberfläche von HUVEC-Zellen.	43
Abbildung 15	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13.	45

Abbildung 16	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch wtADAMTS13.	46
Abbildung 17	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Arg1219Trp.	48
Abbildung 18	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Arg1219Trp.	49
Abbildung 19	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly1239Val.	51
Abbildung 20	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly1239Val.	52
Abbildung 21	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly702Arg.	53
Abbildung 22	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Gly702Arg.	54
Abbildung 23	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Cys400Arg.	55
Abbildung 24	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Cys400Arg.	57
Abbildung 25	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro671Leu.	58
Abbildung 26	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro671Leu.	59
Abbildung 27	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des	60

	proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro353Leu.	
Abbildung 28	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Pro353Leu.	61
Abbildung 29	Mikrofluidischer Assay zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr.	62
Abbildung 30	Immunfluoreszenz zur Analyse des proteolytischen Abbaus von VWF-Fäden durch p.Asp235Tyr.	63
Abbildung 31	Scherabhängige Dysfunktion von ADAMTS13-Mutanten	76

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Liste der verwendeten Geräte. Angabe des Modells bzw. der Seriennummer und des Herstellers.	23
Tabelle 2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. Angabe der Katalognummer und des Herstellers.	24
Tabelle 3	Liste der verwendeten Chemikalien. Angabe der Katalognummer und des Herstellers.	24-25
Tabelle 4	Liste der verwendeten Lösungen/Medien. Angabe des Herstellers und der Katalognummer, bei selbsthergestellten Lösungen Angabe der Zusammensetzung.	25-26
Tabelle 5	Die verwendeten Vektoren. Angabe der Konzentration.	27
Tabelle 6	Die verwendeten Antikörper. Angabe der Lotnummer und des Herstellers.	27
Tabelle 7	Eingesetzte Transfektionsmenge jedes eingesetzten Vektors.	31

VI. Literaturverzeichnis

Ai J., Smith P., Wang S., Zhang P., Zheng X.L. (2005): *The Proximal Carboxyl-terminal Domains of ADAMTS13 Determine Substrate Specificity and Are All Required for Cleavage of von Willebrand Factor*. In: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 33.

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*. In: J BiolChem 279:30896–30903.

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*. In: blood. 107:3161-3166.

Behrends J.C., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S., Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., Wischmeyer E. (2010): *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Bianchi V., Robles R., Alberio L., Furlan M., Lämmle B. (2002): *von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Blood 100(2):710–713.

Bruhn H.D., Hach-Wunderle V., Schambeck C.M., Scharf R.E. (2011): *Hämostaseologie für die Praxis*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH.

Bukowski R.M. (1982): *Thrombotic thrombocytopenic purpura. A review*. In: Prog Hemost Thromb 6: 287–337, 1982.

Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats (2009): *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*. 4. überarbeitete Auflage. Köln: Deutscher Ärzteverlag.

Crawley J.T.B., de Groot R., Xiang Y., Luken B.M., Lane D.A. (2011): *Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor*. In: Blood, 118: 3212-3221.

de Groot R., Bardhan A., Ramroop N., Lane D.A., Crawley J.T. (2009): *Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function*. In: Blood. 2009; 113(22):5609-5616.

Donadelli R., Banterla F., Galbusera M., Capoferri C., Bucchioni S., Gastoldi S., Nosari S., Monteferrante G., Ruggeri Z.M., Bresin E., Scheifflinger F., Rossi E., Martinez C., Coppo R., Remuzzi G., Noris M. (2006): *In-vitro and in-vivo consequences of mutations in the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Thromb Haemost 2006; 96: 454–64.

Dong J.F., Moake J.L., Nolasco L., Bernardo A., Arceneaux W., Shrimpton C.N., Schade A.J., McIntire L.V., Fujikawa K., Lopez J.A. (2002): *ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions*. In: Blood 2002; 100: 4033–9.

Dong J.F., Whitelock J., Bernardo A., Ball C., Cruz M.A. (2004): *Variations among normal individuals in the cleavage of endothelial-derived ultralarge von Willebrand factor under flow*. In: J Thromb Haemost 2004; 2:1460–6.

Dong J.F. (2005): *Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions*. In: J Thromb Haemost 2005; 3:1710–6.

Ferrari S., Scheifflinger F., Rieger M., Mudde G., Wolf M., Coppo P., et al. (2007): *Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity*. In: Blood 2007;109:2815-22.

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*. In: J Thromb Haemost. 2009;7(12):2088-2095.

Freissmuth M., Offermanns S. (2012): *Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Furlan M., Robles R., Solenthaler M., Lämmle B. (1998): *Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Blood 91: 2839–2846, 1998.

Furlan M., Robles R., Morselli B., Sandoz P., Lämmle B. (1999): *Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Thromb Haemost. 1999; 81:8-13.

Furlan M., Lämmle B. (2001): *Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von Willebrand factor-cleaving protease*. In: Best Pract Res Clin Haematol 2001; 14: 437–54.

Fujimura Y., Matsumoto M., Yagi H., Yoshioka A., Matsui T., Titani K. (2002): *von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw–Schulman syndrome*. In: Int J Hematol 2002; 75: 25–34.

Galbusera M., Noris M., Remuzzi G. (2009): *Inherited thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: haematologica | 2009; 94(2).

Gao W., Anderson P.J., Majerus E.M., Tuley E.A., Sadler J.E. (2006): *Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease*. In: Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:19099–104.

Gao W., Anderson P.J., Sadler J.E. (2008): *Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and vonWillebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity*. In: BLOOD, 1 SEPTEMBER 2008_ VOLUME 112, NUMBER 5.

Gardner M.D., Chion C.K., de Groot R., Shah A., Crawley J.T., Lane D.A. (2009): *A functional calcium-binding site in the metalloprotease domain of ADAMTS13*. In: Blood. 2009;113(5):1149-1157.

George J.N. (2006): *Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: N Engl J Med 354:1927–1935.

George J.N. (2008): *Clinical insights from observations on ADAMTS13 deficiency in liver cirrhosis*. In: Thrombosis and Haemostasis. 99:987-988.

Hassenpflug W.A., Angerhaus D., Budde U., Obser T., Schneppenheim R. (2004): *Thrombotic thrombocytopenic purpura in childhood*. In: Hämostaseologie 2004; 24: 71–6.

Herdegen T. (2010): *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 2. Auflage. Kiel: Georg Thieme Verlag.

Hommais A., Rayes J., Houllier A., et al. (2007): *Molecular characterization of four ADAMTS13 mutations responsible for congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome)*. In: Thromb Haemost. 2007;98:593-599.

Jin S.Y., Skipwith C.G., Zheng X.L. (2010): *Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor*. In: Blood. 2010; 115(11):2300-2310.

Klaus C., Plaimauer B., Studt J.D., Dorner F., Lammle B., Mannucci P.M., et al. (2004): *Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Blood 2004;103:4514-9.

Kokame K., Matsumoto M., Soejima K., Yagi H., Ishizashi H., Funato M., Tamai H., Konno M., Kamide K., Kwan Y., Miyata T., Fujimura Y. (2002): *Mutations and common polymorphisms in ADAMTS 13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity*. In: Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 11902–7.

Kokame K., Matsumoto M., Fujimura Y., Miyata T. (2004): *VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13*. In: Blood. 2004;103(2):607-612.

Kokame K., Miyata T. (2004): *Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Semin Hematol 41:34–40.

Kroutvar M. (2010): *ibidi Pump Instruction Manual*. ibidi GmbH 2010, Version 1.5.0.

Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D. Jr., Ginsburg D., Tsai H.M. (2001): *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Nature 413: 488–494, 2001.

Loirat C., Veyradier A., Girma J.P., Ribba A.S., Meyer D. (2006): *Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) deficiency in children*. In: Semin Thromb Hemost 32(2):90–97.

Lotta L.A., Wu H.M., Mackie I.J., Noris M., Veyradier A., Scully M.A., Remuzzi G., Coppo P., Liesner R., Donadelli R., Loirat C., Gibbs R.A., Horne A., Yang S., Garagiola I., Musallam K.M., Peyvandi F. (2012): *Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Blood. 2012;120: 440-448.

Majerus E.M., Anderson P.J., Sadler J.E. (2005): *Binding of ADAMTS13 to von Willebrand Factor*. In: J Biol Chem 280:21773–21778.

Manea M., Kristoffersson A., Tsai H.M., Zhou W., Wingqvist I., Oldaeus G. Billström R., Björk P., Holmberg L., Karpman D. (2007): *ADAMTS13 phenotype in plasma from normal individuals and patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Eur J Pediatr (2007) 166:249–257.

Marin V., Kaplanski G., Gre`s S., Farnarier C., Bongrand P. (2001): *Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells*. In: Journal of Immunological Methods 254 (2001). 183–190.

McKinnon T.A., Chion A.C., Millington A.J., Lane D.A., Laffan M.A. (2008): *N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13*. In: Blood. 2008; 111(6):3042-3049.

Meyer S.C., Jin S., Cao W., Zheng X.L., Lammle B., Kremer Hovinga J.A. (2008): *Characterization of five homozygous ADAMTS13 mutations in hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura - Towards a phenotype-genotype correlation*. In: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008;112: 274.

Michl M. (2011): *Hämatologie*. 2. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag.

Moake J.L., Turner N.A., Stathopoulos N.A., Nolasco L., Hellums J.D. (1988): *Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin*. In: Blood 1988; 71: 1366–74.

Moake J.L. (2002): *Thrombotic microangiopathies*. In: New England Journal of Medicine, 347, 589–600.

Mueller-Eckhardt C., Kiefel V. (2004): *Transfusionsmedizin*. 3. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.

Neumann H.A. (2008): *Das Gerinnungssystem*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.

Noris M., Bucchioni S., Galbusera M., Donadelli R., Bresin E., Castelletti F., Caprioli J., Brioschi S., Scheifflinger F., Remuzzi G. (2005): *Complement factor H mutation in familial thrombotic thrombocytopenic purpura with ADAMTS13 deficiency and renal involvement*. In: JAmSocNephrol 2005; 16: 1177–83.

O'Donnell J.S., McKinnon T.A., Crawley J.T., Lane D.A., Laffan M.A. (2005): *Bombay phenotype is associated with reduced plasma-VWF levels and an increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis*. In: Blood. 2005;106(6):1988-1991.

Palla R., Lavoretano S., Lombardi R., Garagiola I., Karimi M., Afrasiabi A., et al. (2009): *The first deletion mutation in the TSP1-6 repeat domain of ADAMTS13 in a family with inherited thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Haematologica 2009;94:289-293.

Peyvandi F., Lavoretano S., Palla R., Valsecchi C., Merati G., De Cristofaro R., Rossi E., Mannuccio P.M. (2006): *Mechanisms of the interaction between two ADAMTS13 gene mutations leading to severe deficiency of enzymatic activity*. In: Hum Mutat 2006; 27: 330–6.

Peyvandi F., Palla R., Lotta L.A., Mackie I., Scully M.A., Machin S.J. (2010): *ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: J Thromb Haemost 2010; 8: 631–40.

Pimanda J.E., Maekawa A., Wind T., et al. (2004): *Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13*. In: Blood. 2004;103:627-629.

Pötzsch B., Madlener K. (2002): *Gerinnungskonsil*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Pos W., Crawley J.T., Fijnheer R., Voorberg J., Lane D.A., Luken B.M. (2010): *An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF*. In: Blood. 2010; 115(8):1640-1649.

Pruss C.M., Notley C.R., Hegadorn C.A., O'Brien L.A., Lillicrap D. (2008): *ADAMTS13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extent, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of von Willebrand factor*. In: Br J Haematol. 2008;143(4):552-558.

Ricketts L.M., Dlugosz M., Luther K.B., Haltiwanger R.S., Majerus E.M. (2007): *O-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion*. In: J Biol Chem. 2007;282: 17014-17023.

Rock G.A., Shumak K.H., Buskard N.A., Blanchette V.S., Kelton J.G., Nair R.C., Spasoff R.A. (1991): *Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: N Engl J Med 325:393–397, 1991.

Ruggenenti P., Noris M., Remuzzi G. (2001): *Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Kidney Int. 2001 Sep;60(3):831-46.

Sadler J.E. (2002): *A new name in thrombosis, ADAMTS13*. In: Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 11552–4.

Schneppenheim R., Budde U., Obser T., Brassard J., Mainusch K., Ruggeri Z.M., Schneppenheim S., Schwaab R., Oldenburg J. (2001): *Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease*. In: Blood. 2001 Apr 1;97(7):2059-66.

Schneppenheim R., Budde U., Oyen F., Angerhaus D., Aumann V., Drewke E., Hassenpflug W., Häberle J., Kentouche K., Kohne E., Kurnik K., Mueller-Wiefel D., Obser T., Santer R., Sykora K.W. (2003): *von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP*. In: Blood 101:1845–1850.

Schneppenheim R. (2004): *Molecular genetics of von Willebrand disease*. In: Hämostaseologie 2004; 24: 37–43.

Schneppenheim R., Kremer Hovinga J.A., Becker T., Budde U., Karpman D., Brockhaus W., Hrachovinova I., Korczowski B., Oyen F., Rittich S., von Rosen J., Tjonnfjord G.E., Pimanda J.E., Wienker T.F., Lämmle B. (2006): *A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation*. In: *Thromb Haemost* 96(1):3–6.

Schneppenheim R., Budde U. (2011): *von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein*. In: *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Suppl. 1): 209–215.

Schulte am Esch J. 2nd, Robson S.C., Knoefel W.T., Eisenberger C.F., Peiper M., Rogiers X. (2005): *Impact of O-linked glycosylation of the VWF-A1-domain flanking regions on platelet interaction*. In: *Br J Haematol*. 2005;128(1):82-90.

Shibagaki Y., Matsumoto M., Kokame K., Ohba S., Miyata T., Fujimura Y., Fujita T. (2006): *Novel compound heterozygote mutations (H234Q/ R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw–Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure*. In: *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1289–92.

Soejima K., Matsumoto M., Kokame K., Yagi H., Ishizashi H., Maeda H., Nozaki C., Miyata T., Fujimura Y., Nakagaki T. (2003): *ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage*. In: *Blood*. 2003; 102: 3232-3237.

Tao Z., Wang Y., Choi H., Bernardo A., Nishio K., et al. (2005)¹: *Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS-13 under flow*. In: *Blood* 2005;106:141–43.

Tao Z., Peng Y., Nolasco L., Cal S., Lopez-Otin C., et al. (2005)²: *Role of the CUB-1 domain in docking ADAMTS-13 to unusually large von Willebrand factor in flowing blood*. In: *Blood* 2005;106:4139–45.

Tsai H.M., Lian E.C. (1998): *Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: N Engl J Med. 339: 1585–1594, 1998.

Tsai H.M. (2003)¹: *Advances in the Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. In: J Am Soc Nephrol 14: 1072–1081, 2003.

Tsai H.M. (2003)²: *Deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 388–96.

Tsai H.M. (2007): *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Thrombotic Disorder Caused by ADAMTS13 Deficiency*. In: Hematol Oncol Clin North. 21(4):609-v.

Turner N., Nolasco L., Tao Z., Dong J.F., Moake J. (2006): *Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13*. In: J Thromb Haemost. 2006;4(6):1396-1404.

Uchida T., Wada H., Mizutani M., Iwashita M., Ishihara H., Shibano T., Suzuki M., Matsubara Y., Soejima K., Matsumoto M., Fujimura Y., Ikeda Y., Murata M. (2004): *Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura*. In: Blood 2004; 104: 2081–3.

Uemura M., Tatsumi K., Matsumoto M., Fujimoto M., Matsuyama T., Ishikawa M., Iwamoto T., Mori T., Wanaka A., Fukui H., Fujimura Y. (2005): *Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver*. In: Blood. 2005;106(3):922-924.

Wagner D.D., Saffaripour S., Bonfanti R., et al. (1991): *Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propeptide*. In: Cell. 1991;64(2): 403-413.

Weiss H.J., Sussman I.I., Hoyer L.W. (1977): *Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease*. In: J Clin Invest. 1977 Aug;60(2):390-404..).

Wiznitzer A., Mazor M., Leiberman J.R., Bar-Levie Y., Gurman G., Glezerman M. (1992): *Familial occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura in two sisters during pregnancy*. In: Am J Obstet Gynecol 1992;166: 20–1.

Wurm F., Bernard A. (1999): *Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production*. In: Current Opinion in Biotechnology 1999,10:156–159.

Xiang Y., de Groot R., Crawley J.T., Lane D.A. (2011): *Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13 (ADAMTS13)*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. doi:10.1073/pnas.1018559108.

Zanardelli S., Chion A. C. K., Groot E., Lenting P. J., McKinnon T. A. J., Laffan M. A., Tseng M., Lane D. A. (2009): *A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF*. In: BLOOD, 24 SEPTEMBER 2009 _VOLUME 114, NUMBER 13.

Zhang P., Pan W., Rux A.H., Sachais B.S., Zheng X.L. (2007): *The cooperative activity between the carboxylterminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow*. In: Blood. 2007;110(6):1887-1894.

Zhang Q., Zhou Y.F., Zhang C.Z., Zhang X., Lu C., Springer T.A. (2009)¹: *Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(23):9226-9231.

Zhang X., Halvorsen K., Zhang C.Z., Wong W.P., Springer T.A. (2009)²: *Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor*. Science. In: 2009;324(5932):1330-1334.

Zheng X., Nishio K., Majerus E.M., Sadler J.E. (2003): *Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13*. In: J Biol Chem. 2003;278:30136-30141.

Zhou W., Tsai H.M. (2009): *N-Glycans of ADAMTS13 modulate its secretion and von Willebrand factor cleaving activity*. In: BLOOD, 22 JANUARY 2009 _VOLUME 113, NUMBER 4

Zhou Y.-F., Eng E.T, Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. (2012): *Sequence and structure relationships within von Willebrand factor*. In: BLOOD, 12 JULY 2012_VOLUME 120, NUMBER 2.

Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem im Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 28.02.2014

Verfasser: Kristina Kraus