



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Masterarbeit

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

Kinetische Analyse von ADAMTS13-Mutanten mittels eines Scherfluss-Assays

Anton Letzer

Matrikelnummer [REDACTED]

Vorgelegt am: 24.09.2018

1. Gutachter/in Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW, Hamburg)
2. Gutachter/in PD Dr. rer. nat. Maria A. Brehm
(Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor von PD Dr. rer. nat. Maria A. Brehm in der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

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 24.09.2018

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Maria A. Brehm für die Betreuung meiner Masterarbeit im Labor der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum-Eppendorf.

Frau Prof. Dr. Cornelissen danke ich für ihr Gutachten und ihren Besuch während der Masterarbeit.

Ebenfalls ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Gesa König und Tobias Obser für die tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen hilfreichen Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter für die Unterstützung und Ermutigung im gesamten Verlauf des Studiums.

Zudem bedanke ich mich bei der UKE Microscopy Imaging Facility (umif) für die Unterstützung bei der Mikroskopie.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abstract	V
Zusammenfassung	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Einleitung	1
1 Grundlagen	2
1.1 Primäre und sekundäre Hämostase.....	2
1.2 Der von-Willebrand-Faktor	4
1.3 ADAMTS13	6
1.4 Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura.....	8
1.5 Ziel der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Mutagenese	12
2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	14
2.3 Mini Plasmid Präparation	14
2.4 Sequenzierung des Mutageneseortes.....	15
2.5 Sequenzierung der hergestellten Vektoren	16
2.6 Plasmid Präparation.....	17
2.7 Transfektion von HEK293 Zellen.....	18
2.8 Kultivierung von HEK293 Zellen.....	19
2.9 Kultivierung von HUVEC Zellen	20
2.10 Herstellung von rekombinanten Proteinen in HEK293 Zellen	21
2.11 Bestimmung der ADAMTS13-Konzentration mittels ELISA	22
2.12 Transiente Transfektion und Immunfluoreszenz	23

2.13	Scherfluss-Assay mit Primärzellen	25
2.14	Aktivitätstest mittels Light transmission aggregometry	28
3	Ergebnisse	31
3.1	Intrazelluläre Lokalisation von ADAMTS13-Varianten.....	31
3.2	ADAMTS13 Aktivität in Scherfluss-Assays.....	35
3.3	ADAMTS13 Aktivität im Aggregometer Assay.....	40
4	Diskussion	42
4.1	Lokalisation von ADAMTS13 Varianten	42
4.2	Proteaseaktivität der ADAMTS13-Varianten	44
4.3	Optimierung des Scherfluss-Assays	49
4.4	ADAMTS13 Aktivität im Aggregometrie-Assay.....	50
5	Zusammenfassende Diskussion.....	51
6	Literaturverzeichnis	52
7	Tabellenverzeichnis	57
8	Abbildungsverzeichnis	58
9	Anhang.....	A

Abstract

The von Willebrand Factor (VWF) is a multimeric glycoprotein and an essential component of primary hemostasis. The VWF undergoes a conformational change under elevated shear forces that occurs upon vessel damage. VWF recruits platelets to close a wound. This process is controlled by the protease ADAMTS13, which cuts VWF solely when the VWF A2-domain is unraveled by force-induced stretching. Missense-mutations in the corresponding gene of ADAMTS13 can limit the secretion or function of ADAMTS13 to such an extent that platelets form thrombi with ultra-large VWF multimers, resulting in a life-threatening disease. It is known as the congenital form of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), called the Upshaw-Schulman Syndrome (USS).

In this thesis, the activity of several ADAMTS13 variants from patients with USS was measured and compared in shear-flow assays. The shear-flow assay is based on the observation of a kinetic analysis of the proteolysis of VWF-strings on the surface of endothelial cells. Furthermore, preliminary tests of the proteolysis of VWF-platelets-aggregates using aggregometry were conducted. Conclusions can be drawn on structure-function relationships and on the mechanisms responsible for USS.

Because the observed ADAMTS13-variants show significant decreased residual concentrations in the plasma of patients, the intracellular localization was observed in HEK293-cells using immunofluorescence. Using this method, it was possible to get a hint on processing errors during biosynthesis. No significant differences between the variants and no ER-retention was observed. These results suggest that differences in the secretion of ADAMTS13 are not caused by processes in the ER. The explanation of ADAMTS13 secretion deficiency is subject of further research.

Results of the cell-based shear flow assays showed reproduceable strong but varying residual activity of all observed ADAMTS13-variants. This suggests the main USS-causing mechanism of these variants is a secretion deficiency.

The aggregometry-assay showed that it is possible to distinguish ADAMTS13-variants from the wild type protein with a technically simple and less time-consuming procedure. Establishment of such an assay could be used in clinical diagnostics.

Zusammenfassung

Der von-Willebrand-Faktor (VWF) ist als multimeres Glykoprotein ein wesentlicher Bestandteil der primären Hämostase. Der VWF wird unter bei Gefäßschäden auftretendem erhöhtem Scherstress einer Konformationsänderung unterzogen und rekrutiert daraufhin Blutplättchen, um die Wunde zu schließen. Dieser Prozess wird durch die Protease ADAMTS13 reguliert, die den VWF nur dann schneidet, wenn die Schnittstelle in der A2 Domäne des VWF durch kraftbedingte Streckung freigelegt wird. Punktmutationen in ADAMTS13 können die Sekretion oder Funktion von ADAMTS13 soweit einschränken, dass sich Thromben aus ultralangen VWF-Multimeren und Thrombozyten bilden. Hieraus resultiert eine lebensbedrohliche Krankheit, die als thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) oder Upshaw-Schulman Syndrom (USS) bekannt ist.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität von mehreren ADAMTS13-Varianten, die in Patienten mit USS gefunden wurden, in einem Scherfluss-Assay gemessen und verglichen. Dieser Assay basiert auf der kinetischen Analyse der Proteolyse von VWF-Fäden auf der Oberfläche von Endothelzellen. Zusätzlich wurden präliminäre Versuche durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Proteolyse von VWF-Plättchen-Aggregaten durch ADAMTS13 auch aggregometrisch bestimmt werden kann. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf Struktur-Funktions-Beziehungen und Einblicke in die USS-verursachenden Mechanismen liefern.

Da die untersuchten ADAMTS13-Varianten im Patienten sehr geringe Plasmakonzentrationen aufweisen wurde außerdem ihre intrazelluläre Lokalisation in HEK293-Zellen mittels Immunfluoreszenz bestimmt, um Hinweise auf Prozessierungsfehler während der Biosynthese zu erhalten. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten und keine signifikante ER-Retention. Diese Daten sprechen dafür, dass Unterschiede in der Sekretion von ADAMTS13 nicht durch Prozesse im ER verursacht werden. Die Aufklärung der Sekretionsdefekte wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Mittels des zellbasierten Flussassays konnte erfolgreich und gut reproduzierbar gezeigt werden, dass alle hier untersuchten ADAMTS13-Varianten unterschiedlich stark ausgeprägte Restaktivitäten aufweisen. Dieser Befund deutet daraufhin, dass der Hauptmechanismus, durch den diese Varianten USS verursachen, eine Reduktion der Sekretion ist. Der aggregometrische Assay zeigte die Unterscheidbarkeit von ADAMTS13-Varianten zum Wildtyp mit einem technisch einfachen und nicht zeitaufwändigen Assay. Eine Etablierung eines solchen Assays könnte in der klinischen Diagnostik Verwendung finden.

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS13	a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-motiv
ADP	Adenosindiphosphat
AS.....	Aminosäure
CHO -Zellen	Chinese Hamster Ovary Zellen
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium
ECGM.....	Endothelia Growth Medium
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal Calf Serum
GP	Glykoprotein
HEK.....	Human embryonic kidney cells
HRBS	Hepes buffered ringer solution
HUVEC.....	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
LB	lysogeny broth
LTA.....	Light transmission aggregometry
MP	Metalloprotease
PBS	phosphate buffered saline
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
RT.....	Raumtemperatur
TTP.....	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
UL.....	Ultra Lang
USS	Upshaw-Schulman-Syndrom
VWF	von-Willebrand-Faktor
WPB's.....	Weibel-Palade bodies
WT.....	Wildtyp

Einleitung

Der von-Willebrand-Faktor (VWF) ist als multimeres Glykoprotein ein wesentlicher Bestandteil der primären Hämostase. Seine spezielle Aktivierung und Modulation durch Scherkräfte sind einzigartig unter den Plasmaproteinen und Gegenstand aktueller Forschung.

Der VWF wird unter bei Gefäßschäden auftretendem Scherstress einer Konformationsänderung unterzogen und rekrutiert daraufhin Blutplättchen, um die Wunde zu schließen. Die Länge von VWF-Multimeren und damit ihre hämostatische Aktivität wird von der Protease ADAMTS13 (a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-typ 1 motif, member 13) reguliert (Furlan et al. 1996; Tsai 1996). Punktmutationen in ADAMTS13 können ihre Funktion einschränken, und so zum Upshaw-Schulman-Syndrom (USS), der hereditären Form der thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) führen. Diese Krankheit ist durch ein Vorkommen von VWF-Multimeren in unphysiologisch großer Länge gekennzeichnet, was zur Bildung von Mikrothromben führt. Ohne Behandlung resultieren daraus schwere Symptome durch zahlreiche Gerinnsel in der Mikrozirkulation mit potentiell letalen Folgen.

Als Ursache der TTP sind verschiedene molekulare Mechanismen einer ADAMTS13-Defizienz möglich: Neben einer reduzierten proteolytischen Aktivität treten auch eine verringerte Sekretion und Nonsense Mediated Decay der mRNA von ADAMTS13 auf (Hassenpflug et al. 2018). Im Phänotyp ergeben sich verschieden schwere Krankheitsbilder, abhängig von dem Genotyp und Umwelteinflüssen.

Die Aktivität von ADAMTS13 Varianten kann statisch und unter Scherfluss untersucht werden. Die Nutzung von Scherfluss-Assays bietet die Möglichkeit, die Aktivität von ADAMTS13 Varianten unter mehr physiologischen Bedingungen zu messen (Kraus et al. 2014). Die Ergebnisse sind von Interesse, um bei Patienten die Ursache und die Symptome der Phänotypen besser abschätzen zu können und um weitere Einblicke in Funktionsmechanismen zu erhalten.

1 Grundlagen

1.1 Primäre und sekundäre Hämostase

Die Hämostase ist eine übergreifende Bezeichnung für physiologische Prozesse, die die Blutungsstillung nach einer Gefäßverletzung beim Menschen innerhalb von ein- drei Minuten sicherstellen. Diese Vorgänge können in die primäre und sekundäre Hämostase unterteilt werden.

Die primäre Hämostase umfasst die Stadien Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaggregation und die Bildung eines weißen Thrombus. Die Vasokonstriktion wird direkt nach der Verletzung durch Ausschütten von Mediatoren wie Endothelin-1, Angiotensin II und Thromboxan A₂ initiiert (Kneser et al. 2016).

Die Adhäsion der Thrombozyten vermittelt der von-Willebrand-Faktor (VWF), ein oligomeres Glykoprotein, das in Weibel-Palade-Körperchen (Weibel-Palade bodies (WPB's)) von Endothelzellen und α -Granula in Thrombozyten gespeichert und bei einer Verletzung freigesetzt wird (Schmidt et al. 2005). An dem VWF, der sich in dem durch die Verletzung freigesetztes Kollagen verankert, werden Thrombozyten über ihren spezifischen Rezeptor, dem Glykoprotein (GP) Ib, gebunden (Kneser et al. 2016).

Thrombozyten besitzen Rezeptoren für Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin, an denen diese haften können. Die Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation ist in **Abbildung 1** dargestellt. Damit einher geht eine Verformung der Thrombozyten, die durch Kalzium-Signalling verursacht wird. Unter dem Einfluss von Adenosindiphosphat (ADP) aus der Umgebung des verletzten Bereiches kommt es zu einer reversiblen Aggregation. Diese ADP-Wirkung wird durch Thrombin, Adrenalin, Serotonin und weitere Faktoren verstärkt (Schmidt et al. 2005). ADP vermittelt während der Thrombozytenaggregation auch eine Konformationsänderung des Rezeptors GPIIb/IIIa. An diesen Rezeptoren binden VWF und Fibrinogen und vernetzen Blutplättchen im größeren Umfang.

Sind diese Vorgänge abgeschlossen, hat sich ein weißer Thrombus gebildet, der die vorübergehende Blutstillung sichert. Stimulatoren der Aggregation sind ADP, Thrombin und Thromboxan A₂, durch die der Thrombozytenthrombus weiter stabilisiert wird (Schmidt et al. 2005).

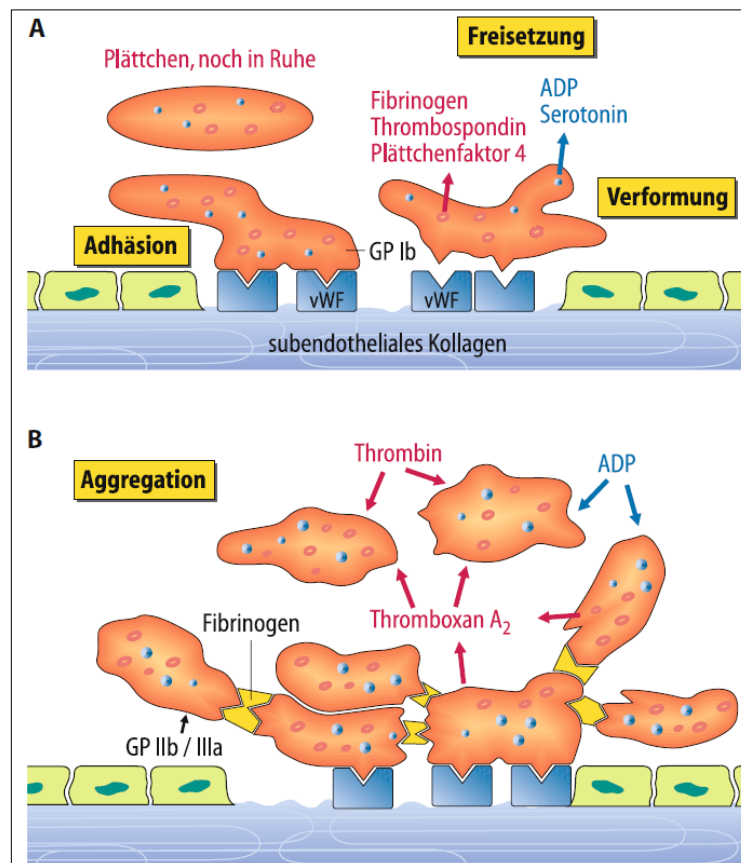


Abbildung 1: Thrombozytenadhäsion und -aggregation als Teil der primären Hämostase. (A) Thrombozytenadhäsion: Die Blutplättchen verformen sich und adhären über den Rezeptor GPIIb am vWF, der im subendothelialen Kollagen verankert ist. (B) Thrombozytenaggregation: Die Integrine IIb und IIIa der Thrombozytenmembran werden durch ADP aktiviert und binden Fibrinogen, das die Plättchen aggregieren lässt. Stimulatoren der Aggregation sind ADP, Thrombin und Thromboxan A₂ (Abbildung: Schmidt et al. 2005).

In der sekundären Hämostase wird ein beschädigtes Gefäß endgültig abgedichtet. Sie lässt sich in die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase einteilen. In **Abbildung 2** sind die Phasen der sekundären Hämostase dargestellt.

In der Aktivierungsphase wandelt der Prothrombinaktivator Prothrombin in Thrombin um. Thrombin spaltet in der Koagulationsphase Fibrin von Fibrinogen ab, ein Faserstoff, der Blut in dem betroffenen Bereich gallertartig werden lässt. In der Retraktionsphase wird der Wundverschluss weiter gefestigt und die Wundränder zusammengezogen. (Schmidt et al. 2005).

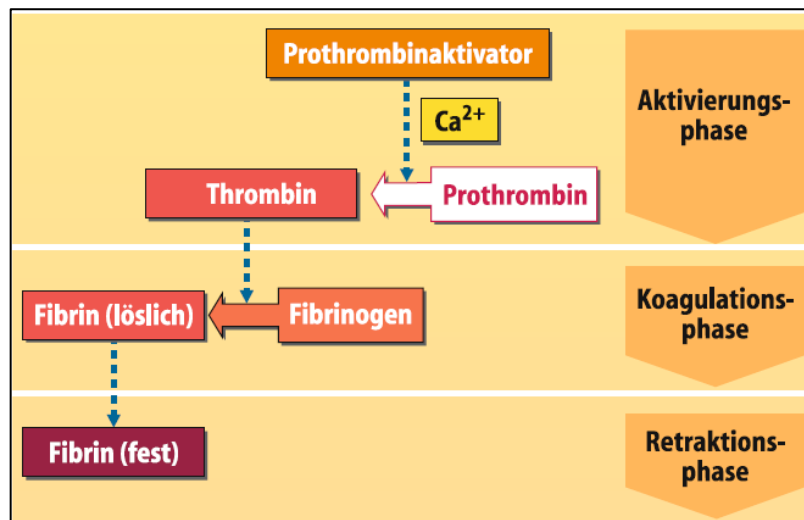


Abbildung 2: Schema der Blutgerinnung. Nach der primären Hämostase folgen die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase aufeinander. Festes Fibrin sorgt dafür, dass die Blutstillung am Ort der Verletzung permanent erfolgt (Schmidt et al. 2005) .

1.2 Der von-Willebrand-Faktor

Der VWF wurde nach Erik Adolf von Willebrand benannt, einem finnischen Arzt, der eine mit VWF assoziierte Erkrankung von der bisher bekannten Hämophilie abgrenzte (Willebrand 1999).

Die Synthese von VWF findet in Endothelzellen und Megakaryozyten statt (Sporn et al. 1985). Sie beginnt mit einem 360 kDa großen Vorläuferprotein, das durch Abspaltung eines Propeptids, Glykosylierungen und der Formation von Disulfidbrücken als posttranslationalen Modifikationen in das 250 kDa große gereifte Monomer entsteht. Die Glykosylierung und Dimerisierung findet im ER statt. Darauf folgt die Prozessierung der Kohlenhydrate und Sulfatierung im Golgi-Apparat, erst danach bilden sich Multimere, während die Prosequenz abgespalten wird. (Wagner 1990).

Den VWF zeichnet eine komplexe, multimere Struktur aus, die sehr lang werden kann. VWF Multimere sind die größten, noch löslichen Proteine in Säugetieren und können eine Größe von >10,000 kDa erreichen (Wagner 1990).

Die Domänen von VWF sind in **Abbildung 3** dargestellt. N-terminal befinden sich ein Signalpeptid und das Propeptid, die durch die Protease Furin abgespalten werden. Die D' und D3 Domäne binden Faktor VIII. Die A1-Domäne ist die Bindungsstelle für GPIIb α , in A2 befindet sich die ADAMTS13-Schnittstelle. Die A3 Domäne enthält eine Kollagen Bindungsstelle. C-terminal befindet sich eine Cystine Knot (CK) Domäne, die

die Cysteine enthält, die von der Proteindisulfidisomerase A1 genutzt werden um den VWF mithilfe von Disulfidbrücken zu dimerisieren (Lippok et al. 2016).

Die Multimerisierung findet im Golgi-Apparat über die D'D3 Domäne von VWF statt, da hier der pH-Wert auf 6,2 sinkt (Zhou et al. 2011). Dadurch wird das Propeptid aktiviert, welches die N-terminale Disulfidbrückenbildung katalysiert. Es entsteht so eine blumenartige Struktur, die sich zu einer helikal kondensierten Struktur in WPB's zusammenfindet. Von hier aus kann nach Stimulation durch einen geeigneten Agonisten die Sekretion von VWF erfolgen. Ca. 20 % des VWF wird in Megakaryozyten hergestellt und anschließend in den α -Granula von Blutplättchen gespeichert.

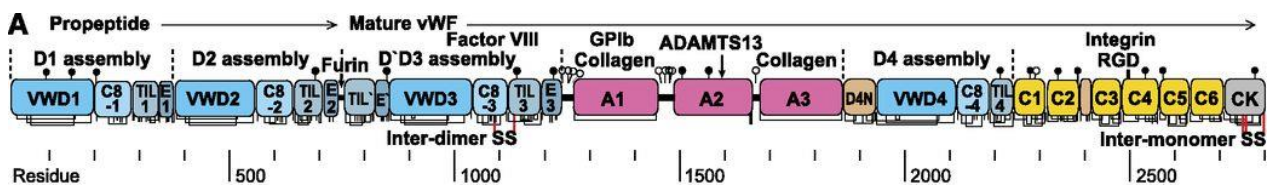


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänen des VWF. N-terminal befindet sich ein Signalpeptid, das die Sekretion ermöglicht. Das Propeptid wird vor der Sekretion durch die Protease Furin abgespalten. (Zhou et al. 2012; Springer 2014) .

In der globulären Form wird die VWF A2 Domäne von einer Disulfidbrücke zwischen Cys1669-Cys1670 zusammengehalten. In dieser Form ist lediglich die Kollagenbindungsstelle der A3 Domäne exponiert. Unter Scherfluss werden die VWF A Domänen gestreckt, wie in **Abbildung 4** dargestellt. Dabei wird die GPIIb Bindungsstelle der A1 Domäne, sowie nachfolgend auch die Bindungsstelle für ADAMTS13 exponiert (Crawley et al. 2011).

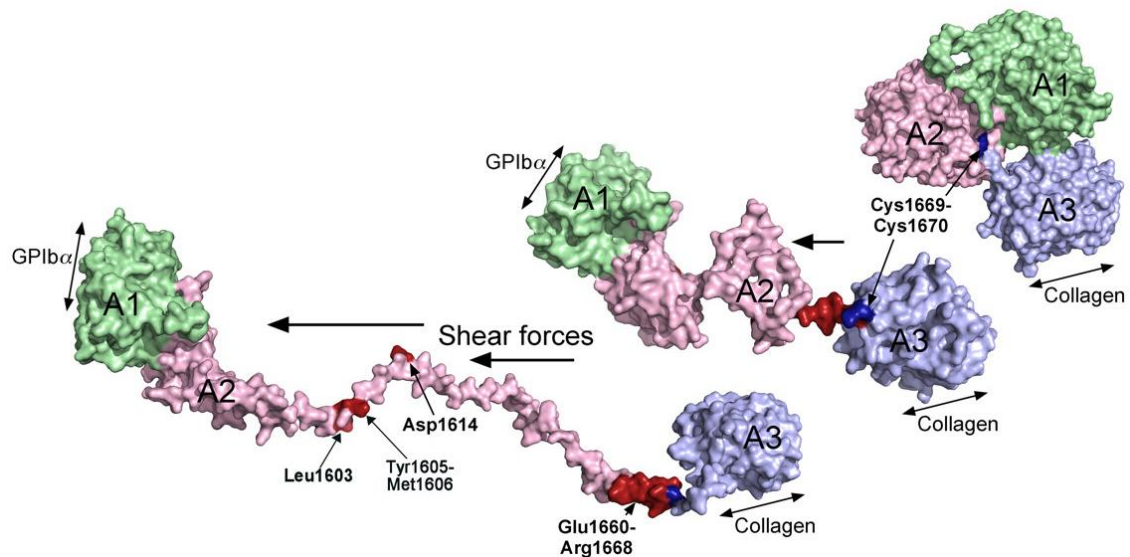


Abbildung 4: Exposition von funktionellen Domänen von VWF, ausgelöst durch Scherkräfte. In der globulären Form sind die VWF A1-A2-A3 Domänen geschlossen. Der molekulare Cystein „Stecker“ bei Cys1669-Cys1670 löst sich unter Einfluss von Scherkräften. So wird die GPIb α Bindungsstelle der A1 Domäne exponiert, sowie die Schnittstelle von ADAMTS13 (Abbildung: Crawley et al. 2011) .

1.3 ADAMTS13

ADAMTS13 ist eine VWF-spezifische Protease, die den VWF nur dann schneidet, wenn die A2 Domäne durch Scherkräfte exponiert wurde. Sie reguliert damit unter Scherfluss die Länge von VWF und verhindert das Auftreten von ultralangem (UL)-VWF.

Die Struktur von ADAMTS13 beginnt mit einem Signalpeptid und einem Propeptid, die jeweils im ER und Golgi entfernt werden (Rodgers 2015).

ADAMTS13 wird von den Sternzellen der Leber als aktives Enzym sekretiert (Uemura et al. 2005). Die Konzentration von ADAMTS13 in menschlichem Plasma liegt normalerweise zwischen 0,7–1,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Rieger et al. 2006).

Die gereifte ADAMTS13, wie in **Abbildung 5** dargestellt, beginnt N-terminal mit der Metalloprotease (MP)-Domäne. Sie beinhaltet drei Histidine, die ein Zn^{2+} -Ion koordinieren. In Kombination mit Glu225 wird ein Wassermolekül zum spaltbaren Bereich des VWF (Tyr1605–Met1606) in der A2 Domäne geführt. Ebenfalls essentiell für eine effektive Spaltung ist ein Ca^{2+} -bindender Bereich in der Nähe des aktiven Zentrums der MP Domäne (Crawley et al. 2011).

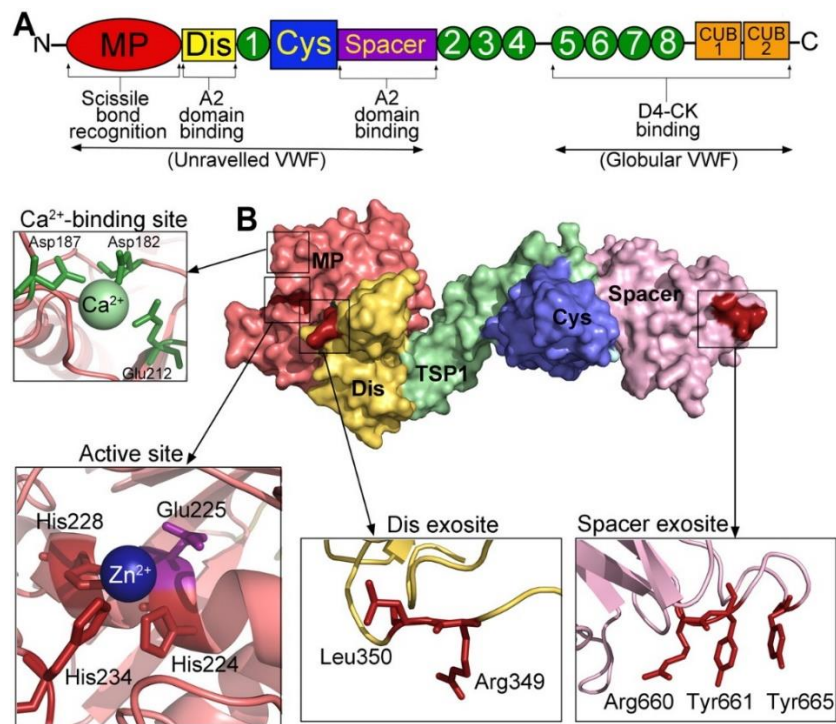


Abbildung 5: (A) Darstellung der Domänen von ADAMTS13 (B) Strukturmodell der N-terminalen Domänen von ADAMTS13. Skizziert sind die Ca^{2+} -bindende Region, das aktive Zentrum mit dem koordinierten Zn^{2+} , die Dis-Domäne und die Spacer-Domäne (Abbildung: Crawley et al. 2011).

In **Abbildung 6** sind die Vorgänge der Interaktion zwischen ADAMTS13 und dem VWF dargestellt, die zur proteolytischen Spaltung des VWF führen.

ADAMTS13 bindet mit den thrombospondin type 1(TSP)-Repeats (4-8) oder CUB Domänen schon an der VWF D4 Domäne von globulären VWF mit niedriger Affinität (Feys et al. 2009) **(C)**. Nach der Bindung von Plättchen über $\text{GPIIb}\alpha$ an die A1 Domäne, unter Bedingungen mit erhöhten Scherkräften, wird die VWF A2 Domäne durch das Öffnen des Disulfid-Steckers bei Cys1669-Cys1670 gestreckt **(D)**. Dadurch werden sekundäre Bindungsstellen in der nun geöffneten A2-Domäne exponiert an der die Spacer Domäne von ADAMTS13 binden kann (Crawley et al. 2011). **(E)**

Es folgt eine Interaktion zwischen der Disintegrin (DIS)-Domäne von ADAMST13 mit Asp1614 von VWF in der Nähe der Schnittstelle von VWF, der sich hier genähert wird **(F)**. So findet eine Interaktion zwischen der S3 Region der ADAMTS13 Metalloprotease (MP) Domäne mit Leu1603 in VWF statt **(G)**. Abschließend führt eine Interaktion von S1 und S1' der MP-Domäne mit der Schnittstelle in VWF (Im Bild: YM) zur proteolytischen Spaltung von dem VWF **(H)**.

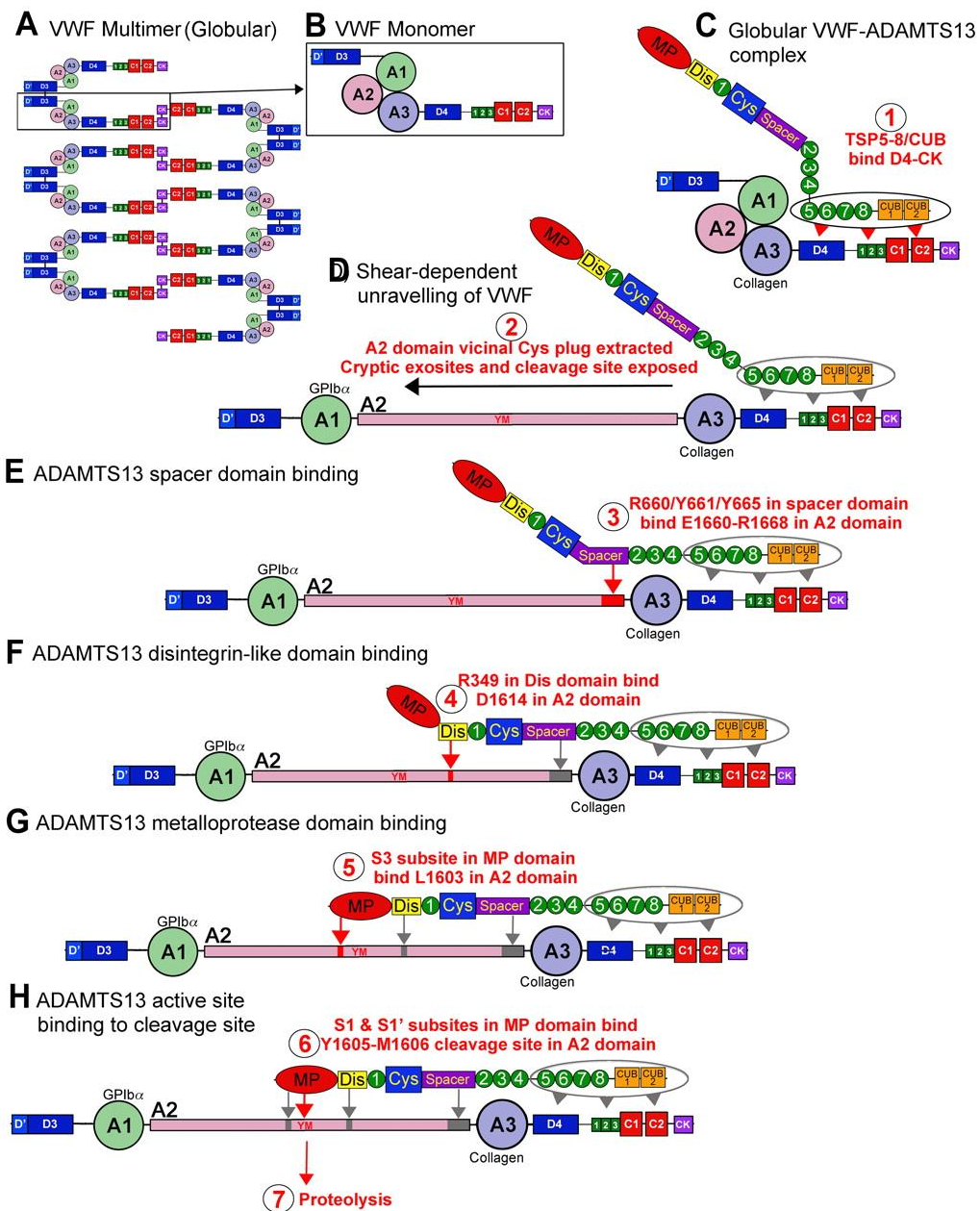


Abbildung 6: Interaktion von ADAMTS13 mit VWF (A,B) Die VWF Monomere zirkulieren als Multimere in einer globulären inaktiven Struktur. (C-H) Eine Abfolge bestimmter Interaktionen zwischen ADAMTS13 und VWF endet mit der Proteolyse von VWF. Auf die Bindung von ADAMTS13 und globulärem VWF (C) folgt unter Scherfluss die Öffnung der A2 Domäne von VWF (D). ADAMTS13 klappt nun auf VWF, wodurch die in (E-H) dargestellten Interaktionen das aktive Zentrum von ADAMTS13 mit der Schnittstelle von VWF zusammenbringen (H). Die Abbildung bezieht sich auf eine ältere VWF-Nomenklatur. Die detaillierte Bildbeschreibung ist im obigen Fließtext zu finden. (Abbildung: Crawley et al. 2011)

1.4 Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

Erstmal beschrieben wurde die Krankheit TTP 1924 von Dr. Eli Moschowitz, mit der Namensgebung beschrieb er die auftretenden Symptome. Erst 1978 beschrieb Dr. Jefferson D. Upshaw die hereditäre Form der TTP, ähnlich der TTP, aber mit einer konstitutiven Störung eines Plasmafaktors (Rodgers 2015). Diese Form der TTP wird daher als Upshaw-Schulman Syndrome (USS) bezeichnet.

Die Symptome des USS werden durch unphysiologisch große Multimere von VWF verursacht, die durch eine Beeinträchtigung von ADAMTS13 entstehen, wie in **Abbildung 7** dargestellt ist. Aus dieser Beeinträchtigung resultieren mikroangiopathische hämolytische Anämie, Ischämie, Nierenversagen, Thrombozytopenie, neurologische Schäden, Fieber und Schlaganfälle (Hassenpflug et al. 2018; Rodgers 2015). Oft nimmt die Krankheit unbehandelt früh einen letalen Verlauf.

Während die erworbene TTP durch Autoantikörper gegen ADAMTS13 verursacht wird, resultieren die Symptome beim USS aus defizienten Varianten von ADAMTS13. Es sind über 120 USS-verursachende Mutationen bekannt (Lotta et al. 2010). Die TTP ist eine seltene Krankheit mit ca. 3,7 Neuerkrankungen pro Millionen Menschen pro Jahr (Török et al. 1995).

Die erworbene TTP zeichnet eine verringerte Konzentration von ADAMTS13 im Plasma aus, die als 62.5 – 730 ng ml⁻¹ angegeben wird, während der Normal-Bereich mit 740-1420 ng ml⁻¹ angegeben wird. (Rieger et al. 2006) TTP zeichnet sich durch eine ADAMTS13 Aktivität von $\leq 5\%$ aus (Schneppenheim et al. 2003). Die hereditäre Form tritt mit geringerer Prävalenz auf. Die Diagnose von USS kann auf einem starken Defizit von ADAMTS13 basieren ($<5\%$), ohne dass Antikörper gegen ADAMTS13 festgestellt werden (Rieger et al. 2006).

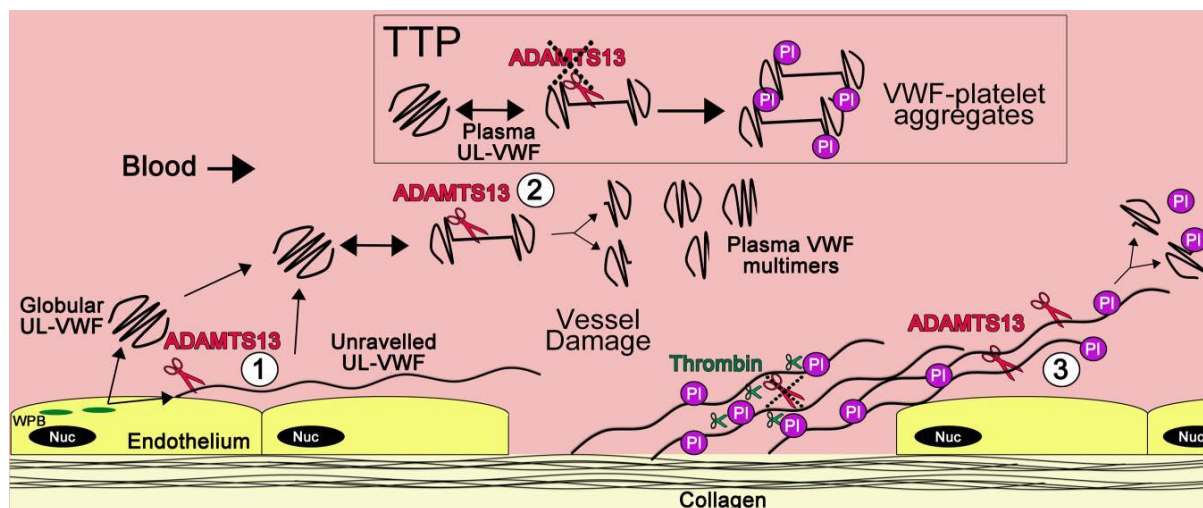


Abbildung 7: Darstellung eines durch ADAMTS13-Defizienz entstehenden Thrombus in einem Blutgefäß bei einer TTP Erkrankung. VWF wird in den WPBs in Endothelzellen gespeichert (grün). Bei der Sekretion werden VWF Multimere in unterschiedlicher Länge sekretiert, ein Anteil davon als UL-VWF. (1) Ein Anteil bleibt an den Endothelzellen hängen und wird durch ADAMTS13 geschnitten. (2) UL-VWF wird durch Scherkräfte gestreckt und durch ADAMTS13 in physiologisch verträgliche Multimere geschnitten. (3) Auch bei der Bildung eines Thrombus werden zu große VWF Stränge geschnitten und der Umfang des Wundverschlusses damit reguliert. Bei einer TTP oder USS bleibt das Schneiden durch ADAMTS13 aus oder findet in zu geringem Umfang statt, was zu VWF-Plättchenaggregaten führt, die die Symptome hervorrufen. (Abbildung: Crawley et al. 2011)

Die Behandlung von TTP kann wiederholt alle 2-3 Wochen mit ADAMTS13-haltigem Fresh Frozen Plasma erfolgen, was durch eine Erhöhung der ADAMTS13 Aktivität schnell zu einer temporären Besserung führt (Lämmle et al. 2005; Zheng 2015).

Wiederholte Transfusionen mit Plasma bergen allerdings das Risiko von Infektionen mit Pathogenen wie Viren oder Prionen sowie Immunreaktionen, insbesondere bei pädiatrischen Anwendungen. (Rodgers 2015; Zheng 2015) Ein weiterer Nachteil dieser Art der Behandlung ist der regelmäßige Zeitaufwand und eine Beeinträchtigung der Lebensqualität. Rekombinante ADAMTS13 aus Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen wurde von Scully et al. (2017). bereits in einer Phase-1 first-in-human Studie getestet, ein Medikament ist jedoch noch nicht auf dem Markt.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen verschiedene genetische ADAMTS13-Varianten, die in Patienten mit USS beschrieben wurden, auf ihre intrazelluläre Lokalisation und ihre Aktivität unter Flussbedingungen untersucht werden. Die für die Herstellung der Proteine notwendigen Plasmide sollen mittels Mutagenese hergestellt, stabil in HEK293 Zellen transfiziert und exprimiert werden. Per Immunfluoreszenz wird die Lokalisation der ADAMTS13-Varianten nach 48-stündiger Expression sichtbar gemacht.

Die proteolytische Aktivität dieser rekombinanten ADAMTS13-Varianten wird unter dynamischen Bedingungen mit einer bereits etablierten Methode gemessen (Kraus et al. 2014). Hierzu werden adhärente Human Umbilical Vein Endothelial (HUVEC)-Zellen, innerhalb eines künstlichen Blutgefäßsystems mit Histamin zur Sekretion von VWF-Fäden auf ihrer Oberfläche angeregt, die dann als Substrat für die ADAMTS13-Varianten dienen. Mithilfe von Zeitreihenaufnahmen werden so Kinetiken erstellt und im Zusammenhang mit der Proteinstruktur diskutiert.

Als Alternative zu dieser Methode soll getestet werden, ob der Abbau von VWF-Thrombozyten-Aggregaten auch mittels Light Transmission Aggregometry (LTA) gemessen werden kann. Hierzu werden VWF und gewaschene Thrombozyten in einem Aggregometer mithilfe von Ristocetin zusammengeführt. Sich bildende Aggregate werden mit ADAMTS13-Varianten Scherkräften ausgesetzt und die Auflösung der Aggregate über die Turbidität gemessen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden zur Herstellung und Quantifizierung von rekombinanten Varianten der ADAMTS13 in stabilen Zelllinien beschrieben. Im Anschluss werden die verschiedenen Assays betrachtet, die genutzt wurden, um die Proteaseaktivität von ADAMTS13-Varianten unter Einfluss von Scherkräften zu messen.

2.1 Mutagenese

In dieser Arbeit werden zwei Mutationen in ADAMTS13, die bei USS-Patienten beschrieben wurden, per Mutagenese in einen Vektor eingebracht, amplifiziert und in HEK293 Zellen eingebracht. Für die Mutagenese wird das QuikChange Kit (Agilent) genutzt.

Tabelle 1: Ansatz des QuikChange Kit (Agilent)

Bezeichnung	Mengenangabe
QuikChange Multi enzyme blend (2.5 U μl^{-1})	1 μl
10x QuikChange Multi reaction buffer b,c	2.5 μl
double-distilled H ₂ O (ddH ₂ O)	Auf 25 μl
dNTP Mixb,c	30 μl
QuikChange Multi enzyme blend (2.5 U μl^{-1})	1 μl
Mutagenic Primers	50 ng
DNA Template (pIRES neo 2 ADAMTS13wt)	50 ng

Die genutzten mutagenen Primer sind in Tabelle 2 dargestellt. Sie enthalten die Missense-Mutation und sind ansonsten komplementär zu dem Bereich um das zu mutierende Basentriplett.

Tabelle 2: Primer zu p.Ile222Thr und p.Cys758Arg von ADAMTS13 (MetaBion), je 0,04 μM . Das zur Punktmutation genutzte Codon ist rot markiert.

Mutation	Primer
p.Ile222Thr: (5'-3')	GGC TTC GAC CTG ACC ACT GCC CAT GAG ATT GGG CAC AGC
p.Cys758Arg: (5'-3')	CTT CGG CCC ATG CAG CGC CTC CCG TGG GGG TGG CCT GCG GGA GCG

Als Template für die Mutagenese wurde der Vektor pIRES neo 2 wtADAMTS13 genutzt. Der Leervektor ist in **Abbildung 8** dargestellt. In diesen Vektor wurde zuvor von Tobias Obser (PHO, UKE) die cDNS des Wildtyps (WT) von ADAMTS13 kloniert und mit einem Signalpeptid versehen, damit die ADAMTS13 von den exprimierenden Zellen in das Medium abgegeben wird.

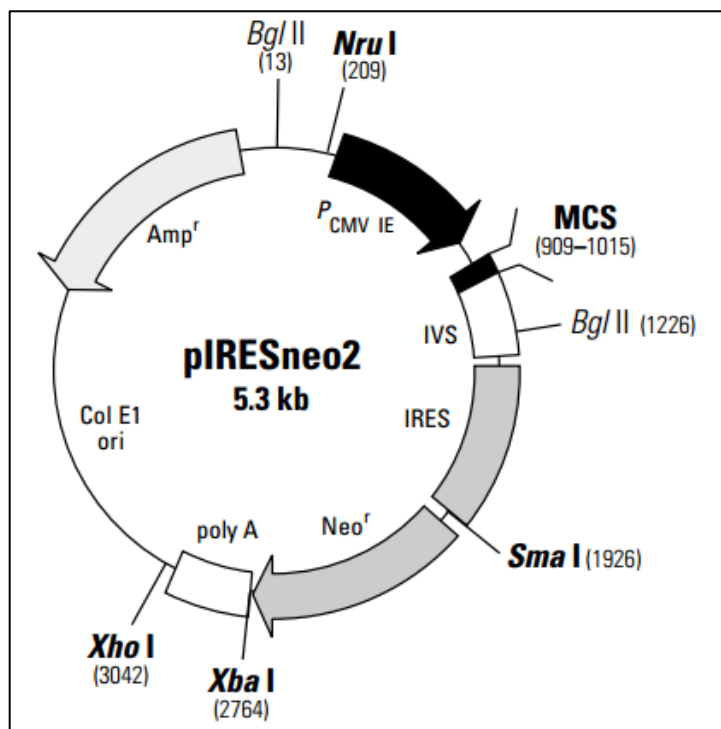


Abbildung 8: Vektorkarte des pIRES neo 2 Vektors. Bezeichnend sind die Ampicillinresistenz (Amp^r), die Neomycin-Geneticin-Resistenz (Neo^r) und die Multiple Cloning Site (MCS).

Die Reagenzien des Kits werden nach Anleitung in einem Mikroreaktionsgefäß zusammengeführt (Tabelle 1).

Für die Genloci wird jeweils ein Ansatz gemacht. Im Thermocycler wird, wie in Tabelle 3 aufgelistet, mit einer initialen Denaturierung verfahren.

Tabelle 3: Parameter des Thermocyclers für die Mutagenese

Segment	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 min
2 (12 Zyklen)	95°C	1 min
	55°C	1 min
	65°C	28 min

Dpn1 ist eine Endonuclease, die spezifisch für den Verdau von methylierter und hemimethylierter DNS ist (Agilent 2005). Es wird 1 µl Dpn1 zum Verdau der Templates hinzugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert.

2.2 Transformation von *E. coli*

Mit den nun fertigen Vektoren (Tabelle 4) werden *E. coli* transformiert. Die Kit-Materialien sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 4: Für Transformation genutzte Plasmide

Plasmid	Volumen
pIRES neo 2 ADAMTS13 p.Ile222Thr	4 µl
pIRES neo 2 ADAMTS13 p.Cys758Arg	4 µl

Tabelle 5: One Shot® Mach1™-T1R Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)

Bezeichnung
S.O.C. Medium
Mach1™-T1R Zellen
AGAR-Platte
LB + Carbenicillin 100 ug ml ⁻¹

Kompetente *E. coli* Mach1™-T1R Zellen werden mit je 4 µl der Vektoren auf Eis 30 min inkubiert. Darauf folgt ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C. Es werden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und bei 37°C für 1 h im Schüttler inkubiert. Ein Volumen von 160 µl der transformierten Zellen werden nun auf Carbenicillin AGAR-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3 Mini Plasmid Präparation

Die in *E. coli* hergestellten Plasmide werden isoliert und gereinigt, so dass mit einer Sequenzierung geprüft werden kann, ob ausschließlich die eingebrachten Mutationen vorhanden sind. Die nötigen Materialien sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: PureLink® Quick Plasmid DNS Miniprep Kit (Invitrogen)

Bezeichnung
Resuspension Buffer
RNase A
Lysis Buffer
Precipitation Buffer
Wash Buffer W9
Wash Buffer W10
TE Buffer
Wash and Recovery Tubes
Spin Column

Nach der Transformation und Vermehrung der Vektoren in *E. coli* werden die Plasmide isoliert und gereinigt. Hierzu wird das PureLink Quick Plasmid DNS miniprep Kit (Invitrogen) genutzt. Pro Transformationsansatz werden 10 unterschiedliche Kolonien gepickt und in 2 ml Flüssigkultur in lysogeny broth (LB) Medium mit dem Antibiotikum Carbenicillin überführt. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Je 1 ml der Übernachtskulturen wird in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 20080 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird jeweils mit 250 µl Resuspensionspuffer suspendiert. Es werden jeweils 250 µl Lysepuffer hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Die Ansätze werden 5 min bei RT inkubiert. Pro Reaktionsgefäß werden 350 µl Präzipitationspuffer dazugegeben und invertiert.

Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 14000 x g für 5 min. Die Überstände werden jeweils auf eine Säule mit Silica Matrix gegeben, die an ein Vakuum-Manifold angeschlossen ist. Unter Einwirkung des Vakuums wird der Überstand durch die Säule gesogen. Es werden 500 µl Waschpuffer 1 dazugegeben und im Anschluss 700 µl des Waschpuffers 2. Um Rückstände der Waschpuffer zu entfernen, wird bei 14000 x g für 2 min zentrifugiert. Die Säulen werden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße gegeben und mit 75 µl TE-Puffer benetzt. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt zur Elution bei 14000 x g für 2 min. Die Plasmid-DNS wird anschließend für die Sequenzierung präpariert.

2.4 Sequenzierung des Mutageneseortes

Um den Erfolg der Mutagenese beurteilen zu können und entsprechend pro Mutation einen Klon auszuwählen, wird mit einer Cycle-Sequencing-Reaktion jeder Plasmid-DNS Ansatz amplifiziert. Der Ansatz wird über eine Sephadex-Platte entsalzt und gereinigt, mit Formaride versetzt und anschließend mittels Sequenzer analysiert.

Die so erhaltenen Sequenzen werden auf das Vorhandensein der jeweiligen Mutation geprüft, indem die jeweilige Sequenz mit der Ursprungssequenz verglichen und auf eventuelle Sequenzierfehler untersucht wird.

Hierzu werden 5 µl der 100 µM Primer für p.Ile222Thr und p.Cys758Arg mit 45 µl ddH₂O verdünnt. Von diesem Ansatz werden in zwei PCR-Master-Mix Ansätzen nach Tabelle 7 je 18 µl verwendet.

Tabelle 7: PCR Master-Mix

Bezeichnung	Mengenangabe
5x SEQ Puffer	36 µl
Big Dye	18 µl
ddH ₂ O	132 µl

Es werden 3 µl der jeweiligen Plasmid-DNS Ansätze als Template mit 17 µl des PCR-Master-Mix gemischt und mit dem Programm im Thermocycler behandelt, wie in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Konfiguration des Thermocyclers für die PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	3 min
2	99	35°C	30 sec
		60°C	30 sec
		60°C	5 min
3	1	8°C	Pause

Die Proben wurden daraufhin sequenziert und auf das Vorhandensein der korrekten Mutation geprüft.

2.5 Sequenzierung der hergestellten Vektoren

Es wird pro Mutation ein Klon gewählt, der komplett sequenziert wird, um auch Fehler außerhalb des Mutageneseortes auszuschließen. Danach wird eine Präparation der Plasmide durchgeführt. Vor der Transfektion von HEK293 Zellen wird der Genlocus der Punktmutation dann erneut sequenziert.

Hierzu werden in getrennten Ansätzen für die Varianten p.Ile222Thr und p.Cys758Arg jeweils 1,5 µl der 14 verschiedenen Sequenzierprimer (Konzentration der Stocklösung 100 µM) zu 18,5 µl Mastermix gegeben. Zusätzlich werden zwei Ansätze mit den Primern REV und FW, die an dem Vektor vor und nach der codierenden Sequenz von ADAMTS13 binden, angesetzt. So kann die Sequenz auf Polymerasefehler im Vektor außerhalb der ADAMTS13-Sequenz geprüft werden.

Tabelle 9: PCR Master-Mix

Bezeichnung	Mengenangabe
Plasmid p.Ile222Thr / p.Cys758Arg	48 µl
5x SEQ Puffer	48 µl
Big Dye	24 µl
ddH ₂ O	176 µl

Die Ansätze werden im Thermocycler behandelt, wie in Tabelle 8 beschrieben.

Die Sequenzen der durch Mutagenese geänderten ADAMTS13-cDNS werden mit der DNS-Sequenz des Wildtyps verglichen (Tabelle 10).

Tabelle 10: ADAMTS13 Sequenzvergleich nach Sequenzierung

wtADAMTS13 / Variante	Sequenzvergleich
ADAMTS13	661 GCTGCCTCATTACCGAGGACACTGGCTTCGACCTGGGAGTCACCA T TGCCCATGAGATTG
p.Ile222Thr	224 GCTGCCTCATTACCGAGGACACTGGCTTCGACCTGGGAGTCACCA C TGCCCATGAGATTG
ADAMTS13	2281 CGGTGGGAGACTTCGGCCCATGCAGCGCCTC C TGTGGGGGTGGCCTGCGGGAGCGGC
p.Cys758Arg	299 CGGTGGGAGACTTCGGCCCATGCAGCGCCTC C TGTGGGGGTGGCCTGCGGGAGCGGC

2.6 Plasmid Präparation

Für die Transfektion von HEK293 Zellen werden größere Mengen des Plasmids benötigt. Hierzu werden zwei Ansätze 6 ml Carbenicillin-LB-Medium mit 20 µl der Vorkultur angeimpft.

Die Ansätze werden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Es wird nach Anleitung des HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen) verfahren.

Tabelle 11: HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen)

Bezeichnung
Resuspensions Puffer + RNase A
Lyse Puffer
Präzipitations Puffer
Waschpuffer
Wasch und Ernte Gefäße
PureLink™ spin Säule

Die beiden jeweils zusammengehörenden Übernachtkulturen werden nun vereint und für 10 min bei 4200 x g zentrifugiert.

Das Pellet wird in 1,2 ml Resuspensionspuffer + RNase A aufgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je 600 µl Lysepuffer werden dazugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Es findet eine zweite Zentrifugation bei 20800 x g statt, der Überstand wird schrittweise auf die PureLink™ spin Säule in einem Waschgefäß gegeben und je 700 µl 30 s bei 14000 x g zentrifugiert.

Anschließend wird die an die Säulenmatrix gebundene DNS durch Zugabe von 650 µl Waschpuffer und kurze Zentrifugation gewaschen. Das Reaktionsgefäß zur Elution wird mit der Säule bestückt und es werden 80 µl des Elutionspuffers dazugegeben. Es wird 2 min bei RT inkubiert, dann 2 min bei 20800 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 40 µl des Elutionspuffers wird 2 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Eluat enthält konzentrierte Plasmide und kann für Transfektionen verwendet werden.

2.7 Transfektion von HEK293 Zellen

Eine stabile Expression von rekombinanten ADAMTS13 Varianten wird durch die Transfektion und anschließende Selektion von HEK293 Zellen möglich.

Tabelle 12: Materialien zur Transfektion von HEK293 Zellen

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMax-1 500 µg ml ⁻¹ G418	Gibco by life technologies
DPBS (1x)	Gibco by life technologies
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Opti-MEM (1x) + GlutaMax-1	Gibco by life technologies
0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco by life technologies

Tabelle 13: Eingesetzte Plasmide für die Transfektionen

Plasmid	Konzentration	Volumen
PCDNS 3.1 NEO ADAMTS13 p.Leu232Gln	1,9 µg µl ⁻¹	2,10 µl
pIRES neo 2 ADAMTS13 p.Ile222Thr	170 ng µl ⁻¹	23,5 µl
pIRES neo 2 ADAMTS13 p.Cys758Arg	104 ng µl ⁻¹	38,0 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung Selektionsmedium DMEM (1x) + GlutaMax-1 500 µg ml⁻¹ G418

Bezeichnung	Menge	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMax-1	500 ml	Gibco by life technologies
+ FBS (Fetal Bovine Serum)	50 ml	Gibco by life technologies
+ Anti-Anti (100x)	5 ml	Gibco by life technologies
+ Gentamicin Sulfat	0,5 ml	Lonza

HEK293 Zellen werden mit den Vektoren PIRES NEO2 ADAMTS13 p.Ile222Thr, p.Cys758Arg und p.Leu232Gln transfiziert und zu stabilen Zelllinien selektiert.

Pro Transfektionsansatz werden 300 µl OptiMEM mit 15 µl Lipofectamine 2000 und getrennt davon 300 µl OptiMEM mit 4 µg des Plasmids in einem Mikroreaktionsgefäß gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT werden die beiden Ansätze gemischt und 20 min bei RT inkubiert. HEK293 Zellen, 70-80 % konfluent, werden in einer T25 Flasche

mit 3 ml frischem DMEM (Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium) versehen. Das Transfektionsreagenz wird dazugegeben. Diese Kultur wird bei 37°C und 5 % CO₂ für 4 h inkubiert, dann werden 6 ml DMEM hinzugefügt. Am nächsten Tag werden die Zellen wie in Abschnitt 2.7 beschrieben auf eine neue T175 Flasche umgesetzt. Hierzu werden nun 45 ml Selektionsmedium DMEM + 500 µg ml⁻¹ G418 verwendet. Die Kultur wird bei 37°C und 5 % CO₂ für 3 Tage inkubiert. Das Selektionsmedium wird in regelmäßigen Abständen erneuert. Es kann anschließend eine Proteinproduktion erfolgen.

2.8 Kultivierung von HEK293 Zellen

Tabelle 15: Material zur Kultivierung von HEK Zellen

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (1x) Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Gibco
Gentamicyn Sulfate 50 mg ml ⁻¹	Lonza
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Gibco
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
PBS Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (1x)	Gibco
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco
T175 Zellkulturflasche	Sarstedt

HEK (human embryonic kidney) -Zellen bezeichnen eine immortalisierte humane Zelllinie, die aufgrund hoher Performanz und Robustheit unter den eukaryotischen Expressionssystemen bevorzugt verwendet wird.

Das DMEM Medium nach Tabelle 16 wird auf 37°C erwärmt. Von dem Medium werden 9 ml in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt. Die eingefrorenen Zellen werden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und direkt in das Röhrchen überführt. Es wird 5 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 10 ml Medium resuspendiert und in eine T175er Flasche überführt. Die Flasche wird auf 45 ml mit DMEM aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung DMEM HEK293 Medium

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Dulbecco´s Modified Eage Medium (DMEM) (1X) + Glutamax	500 ml	Gibco
+ FBS (Fetal Bovine Serum)	50 ml	Gibco
+ MEM NEAA (non essential amino acid) (100X)	5 ml	Gibco
+ Anti-Anti (100X)	0,5 ml	Gibco

Bei Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % in einer T175 Kulturflasche werden die Zellen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank mit 10 ml magnesium- und

calciumfreiem PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Das verbrauchte Medium wird zuvor verworfen. Mit der Zugabe von 3 ml Trypsin werden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Mit der Zugabe von 7 ml DMEM wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellen werden suspendiert und auf neue Flaschen zusammen (2 ml Zellen) mit 43 ml DMEM aufgeteilt, sodass ein erneutes Wachstum bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank erfolgen kann.

Die Zellen werden für die Produktion von Proteinen und für die transiente Transfektion mit anschließender Immunfluoreszenz verwendet.

2.9 Kultivierung von HUVEC Zellen

Tabelle 17: Material zur Kultivierung von HUVEC Zellen

Bezeichnung	Hersteller
Endothelia Growth Medium (ECGM)	Promocell
Supplement Mix	Promocell
PBS Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (1x)	Gibco
Accutase / AccuMax	PAA
T75 Zellkulturflasche	Sarstedt
HUVEC-Zellen (Single -Donor)	Promocell

HUVEC Zellen sind primäre, nicht immortalisierte menschliche Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen gewonnen werden. Sie werden für vielfältige Forschungsbereiche verwendet, in denen sie als Modell für das Endothel dienen. Insbesondere ist dieser Zelltyp für die Durchführung von Versuchen mit VWF geeignet, da WPBs vorhanden sind (Jiménez et al. 2013).

In dieser Arbeit werden HUVEC Zellen der Passage 5 von einem einzelnen Spender genutzt, die in flüssigem Stickstoff eingefroren vorliegen. Die Durchführung der Kultivierung wird hier beschrieben. Das Endothelial Growth Medium (ECGM) wird auf 37°C erwärmt. Von dem Medium werden 9 ml in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt.

Die eingefrorenen Zellen werden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und direkt in das 15ml-Röhrchen überführt. Bei 21°C wird für 3 min bei 220 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 10 ml Medium resuspendiert und in eine T75 Flasche überführt. Die Zellsuspension wird auf 20 ml aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 95-100 % wird das Medium unter der Sicherheitswerkbank entfernt. Es wird zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Durch eine

Verteilung von 3 ml Accutase, mit der 1 min im Brutschrank inkubiert wird, werden die Zellen abgelöst.

Durch die Zugabe von 9 ml neuem Medium wird die Accutase gestoppt und die Zellen werden resuspendiert. Mit 3 ml der Zellsuspension wird die nächste Passage in einer neuen T75 Flasche weiterkultiviert, die auf 20 ml mit Medium aufgefüllt wird. Nach Passage 6 werden die Zellen verworfen, da die Reproduzierbarkeit von Versuchen mit diesen Zellen nicht mehr gewährleistet werden kann.

2.10 Herstellung von rekombinanten Proteinen in HEK293 Zellen

Tabelle 18: Material zur Expression von Proteinen mit HEK293 Zellen

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMax Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Gibco
Gentamicyn Sulfate 50 mg ml ⁻¹	Lonza
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Gibco
FCS	Gibco
PBS Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (1x)	Gibco
OptiPro Serumfreies Medium	Gibco
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco
T175 Zellkulturflasche	Sarstedt
Amcon Ultra – 30 kDa	Merck
21 x Proteaseinhibitor Mix	Merck

Die Expression eines Proteins durch vorher stabil transfizierte Zellen (siehe Abschnitt 2.7) wird mit Zellen durchgeführt, die 95-100 % konfluent sind.

Die Zellen werden analog zur Subkultivierung in Abschnitt 2.8 gewaschen, trypsinisiert und mit DMEM auf 10 ml aufgefüllt. Von der Zellsuspension werden 7 ml mit 555 ml Medium gemischt und die Zellsuspension auf 12 T175 Flaschen verteilt. Die Zellen werden 3-4 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis sie eine Konfluenz von 85 % erreichen.

Zum Sammeln der ADAMTS13 in serumfreiem Medium, wird das Medium restlos mit einer 10 ml Pipette entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und je 20 ml frisches serumfreies Medium hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen 3-4 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank weiter inkubiert.

Die Zellen können nun verworfen werden, dass ADAMTS13 Protein befindet sich im Medium. Es werden alle Flaschen vereinigt und in 50 ml Rörchen verteilt. Diese werden bei 4°C 10 min bei 1363 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Rörchen überführt und kann nun konzentriert werden.

Für die Konzentrierung werden zwei Zentrifugenröhrchen mit Filter (Amicon Ultra) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa mit proteinhaltigem Medium befüllt und bei 4000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Röhrchen werden jeweils neu befüllt und der Durchlauf jeweils verworfen. Es wird bis auf ein Volumen von circa 2 ml pro Röhrchen konzentriert.

Das so erhaltene Konzentrat wird mit einem Proteaseinhibitor-Mix behandelt und kann nun verwendet werden.

2.11 Bestimmung der ADAMTS13-Konzentration mittels ELISA

Tabelle 19: Materialien zur quantitativen Bestimmung von ADAMTS13 (IMUBIND®)

Bezeichnung	Hersteller
Testpuffer	
Detektionsantikörper	
Enzym Konjugat	
Substrate	
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	
ADAMTS13 Standard 100 ng ml ⁻¹	
Waschpuffer PBS mit 0,05 % Tween-20	Gibco, Sigma

Um die Eigenschaften der unterschiedlichen Varianten vergleichen zu können, wird vor der Durchführung von Scherfluss-Assays die Konzentration von ADAMTS13 mittels eines ELISA bestimmt.

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Immunassay-Verfahren, bei dem ein spezifisches Antigen mit einem Antikörper gebunden wird. Über einen Zweitantikörper wird der Erstantikörper markiert und anschließend mittels einer Farbreaktion nachgewiesen und quantifiziert (**Abbildung 9**). Von allen Proben wird eine Verdünnung im Testpuffer angesetzt. Je 100 µl der Proben werden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird vier-mal mit je 200 µl pro Well gewaschen und im nächsten Schritt je 100 µl des Detektiosantikörpers pro Wells hinzugefügt. Die Platte wird bei RT für 30 min inkubiert und im Anschluss wie zuvor gewaschen. Es werden daraufhin 100 µl des Enzym-Konjugats in die Wells pipettiert. Die Platte wird erneut abgedeckt und für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe von je 100 µl der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung

gestartet und durch Zugabe von 50 μl der 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Der ELISA wird innerhalb von 10 min bei 450 nm in einem Spektralphotometer ausgewertet.

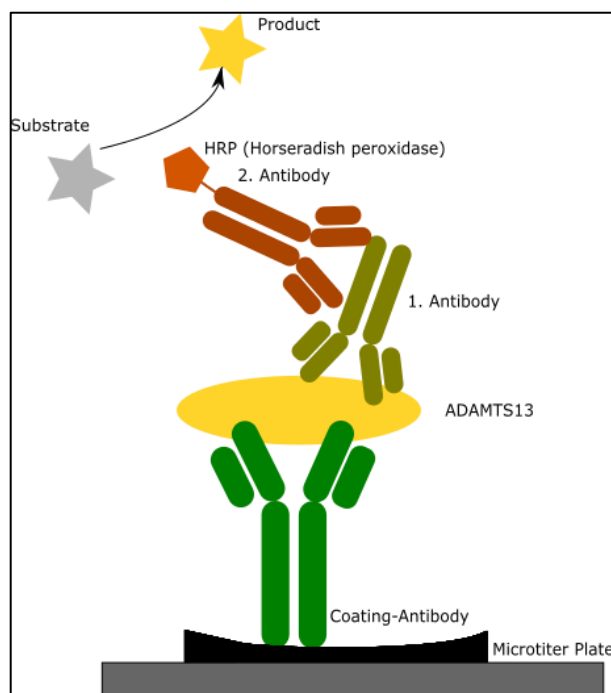


Abbildung 9: Darstellung eines indirekten Sandwich-Elisa zur quantitativen Bestimmung der ADAMTS13 Konzentration.

2.12 Transiente Transfektion und Immunfluoreszenz

Tabelle 20: Material zur transienten Transfektion von HEK293 Zellen

Bezeichnung	Hersteller
8-Well Slide (mit Poly-L-Lysin Beschichtet)	IBIDI
Lipofektamin LTX	Invitrogen
Opti-MEM (1x) + GlutaMax-1	Gibco
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
PBS	Gibco
BSA 1% in PBS	Sigma
Triton x-100 0,3 % in PBS	Sigma
DMEM	Gibco
Plus Reagent	Invitrogen

Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von Zellen bezeichnet das temporäre Einbringen von Genmaterial. Die Plasmide von den in dieser Arbeit untersuchten ADAMTS13-Varianten werden in HEK293 Zellen eingebracht und exprimiert. Im Anschluss wird durch Immunfluoreszenz die Lokalisation von ADAMTS13 sichtbar gemacht.

Konfluente HEK293 Zellen werden 1:20 verdünnt. Pro Well werden 230 µl auf ein 8-Well Slide ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Folgetag werden Transfektionsansätze wie in Tabelle 21 gelistet ohne Lipofektamine LTX pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des LTX wird 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wird das Zellkulturmedium mit 230 µl DMEM erneuert. Anschließend werden pro Well 12,5 µl Transfektionsansatz dazugegeben und vorsichtig verteilt.

Für eine Negativkontrolle werden die Zellen in einem Well mit einem Transfektionsansatz mit wtADAMTS13 behandelt, bei dem später kein Erstantikörper dazugegeben wird.

Das Slide wird über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wird das Medium durch neues DMEM ersetzt.

Tabelle 21: Transfektionsansatz für ein Well

Bezeichnung	Menge
Plasmid	50 ng
Lipofektamin LTX	0,75 µl
OptiMem	50 µl
Plus Reagent	0,25 µl

Fixierung

Das Medium wird 48 Stunden nach dem Medienwechsel entfernt und es wird einmal mit 500 µl PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 3 %-iger Paraformaldehyd-Lösung bedeckt und bei 37°C für 10 min fixiert. Im Anschluss wird mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 0,3 % Triton X-100 in PBS bedeckt und 3 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Es wird erneut mit 500 µl PBS gewaschen. Blockiert wird mit 1 % BSA in PBS, das auf den Zellen für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert wird.

Immunfluoreszenz

Innerhalb der HEK293 Zellen werden Proteindisulfid-Isomerase (PDI), die sich im Endoplasmatische Retikulum (ER) befindet, und ADAMTS13 über spezifische Antikörper markiert. Mit dieser Färbung können Aussagen über die Lokalisation von ADAM im ER während der Expression getroffen werden. Die Antikörper sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22: Antikörper für Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
goat α -ADAMTS13	Dr. Scheifflinger	1:100/ 1:250
mouse α -PDI	Abcam	1:200
donkey α -goat AF488 (Grün)	Thermo Fisher Scientific	1:3000 / 1:5000
rabbit α -mouse AF546 (Rot)	Thermo Fisher Scientific	1:5000

Pro Well werden jeweils 120 μ l der Antikörperverdünnung auf die Zellen gegeben. Die Ansätze werden bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wird zweimal mit PBS gewaschen, und dann pro Well 120 μ l der Verdünnung mit den Zweitantikörpern zugegeben. Die Zellen werden 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Zellen werden danach erneut mit PBS gewaschen und mit PBS überschichtet.

Konfokale Mikroskopie und Auswertung

Die Fluoreszenzaufnahmen werden innerhalb weniger Stunden nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper mit einem konfokalen Mikroskop (Leica SP5) mit einem HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV Objektiv durchgeführt. Die Bildgröße ist 1024 x 1024 px und der Zoom wird bei allen Aufnahmen auf 3,0 eingestellt.

Die Laserstärke wird auf 11 % für den 561 Laser und 26 % für 488 Laser eingestellt.

Es werden pro ADAMTS13 Mutante je drei unabhängige Transfektionen durchgeführt und jeweils 10 Aufnahmen pro Zelltyp und Versuch gemacht.

Die Intensität der roten und grünen Kanäle werden mit der Software ImageJ mathematisch um einen Wert <100 reduziert, um Rauschen aus der Auswertung auszuschließen. Zur Messung der Kolo-kalisation wird mit dem freien Plug-in Coloc2 der Software ImageJ 1.51j8 der Korrelationskoeffizient einer linearen Regression der Überschneidung von roten und grünen Pixeln im Bereich einer Zelle bestimmt.

Für die bessere Darstellung in dieser Arbeit werden der Kontrast und die Helligkeit der Overlays angepasst.

2.13 Scherfluss-Assay mit Primärzellen

Bestimmte Zellkulturen, die unter Fluss kultiviert werden, lassen Beobachtungen der Zellen zu, die durch den mechanischen Stimulus morphologisch nah an *in vivo* Bedingungen sind. Für die Kultivierung der in Abschnitt 2.9 beschriebenen Endothelzellen unter Fluss wird in dieser Arbeit ein System der Firma IBIDI genutzt, bei der ein unidirektionaler Fluss und definierter Scherstress möglich ist.

Zur Vorbereitung der Scherfluss-Assays werden HUVEC Zellen in ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) bei 37°C und 5 %CO₂ kultiviert. Die HUVEC Zellen werden maximal über 8 Passagen kultiviert, da sie nicht immortalisiert sind und ihre Morphologie über die Zeit verändern.

Tabelle 23: Materialien für Scherfluss- Assays mit Primärzellen

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
0,4 µ Luer Slide	IBIDI
Perfusion Set	IBIDI
ECGM (2 % FCS)	Promocell
Adhäsionsmedium	ECGM 1mM MgSO ₄ 5 % FCS
2% (w/v) Gelatinelösung in PBS	
HUVEC Zellen	Single Donor LOT397Z012
Accutase	Sigma-Aldrich
HRBS Puffer (Hepes buffered ringer solution)	140 mM Natriumchlorid (NaCl) 5 mM Kaliumchlorid (KCl), 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 1 mM Calciumchlorid (CaCl ₂), 10 mM HEPES, pH = 7,4
Histamin 500 mM	Sigma
GPIb-beads	Innovance VWF activity assay kit
Olaf Humidifying Chamber	IBIDI
Fluidic Unit	IBIDI

Ein 0,4 µ Luer µ-Slide mit einem Volumen von 100 µl wird blasenfrei mit einer 2 % Gelatinelösung gefüllt und verschlossen bei 37°C und 5 % CO₂ für 1 h inkubiert. Anschließend wird das Slide mit 1 ml PBS gewaschen. Durch die Beschichtung wird die Adhärenz von Zellen in dem Slide gefördert.

Die konfluenten HUVEC-Zellen in einer T75 Zellkulturflasche werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Accutase für 1 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Stoppen der Aktivität der Accutase werden 7 ml ECGM dazugegeben. Für die nächste Passage werden 3 ml der Zellsuspension mit 20 ml ECGM in eine neue T75er Zellkulturflasche überführt.

Die restlichen 7 ml Zellsuspension werden in ein 15 ml Falcon überführt und bei 22 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet wird in 250 µl Adhäsionsmedium in einem Mikroreaktionsgefäß resuspendiert. Zwecks Reproduzierbarkeit der ausgesäten Zellzahl wird diese in einer Neubauer-Zellkammer bestimmt. Hierzu wird eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt und die Zellzahl bestimmt.

Die Zellsuspension wird anschließend auf $1,45 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} mit Adhäsionsmedium eingestellt. Von diesem Ansatz werden 250 μl blasenfrei in das gelatinebeschichtete Slide gegeben. Die empfindlichen HUVEC Zellen werden bei diesem Vorgang vor Temperaturschwankungen geschützt und haben keinen direkten Kontakt mit dem Boden der Sicherheitswerkbank. Das Slide wird bei 37°C h in einer Olaf Humidifying Chamber (IBIDI) zur Zelladhärenz inkubiert. Im Anschluss werden 500 μl neues Adhäsionsmedium dazugegeben. Über Nacht wird das Slide weiter inkubiert.

Am nächsten Tag wird Adhäsionsmedium erneuert, der Flussversuch kann nun durchgeführt werden. Ein Perfusion Set (**Abbildung 10**) der Kategorie Gelb/Grün von IBIDI (50 cm Schläuche mit einem Durchmesser von 1,6 mm) wird mit 14 ml HBRS Puffer befüllt. Es werden 28 μl Histamin und 100 μl der GPIb-beads dazugegeben. Es werden Luftblasen aus dem System entfernt und das Slide mit den HUVECs unter der Sicherheitswerkbank angeschlossen. Das Slide wird in einer Klimakammer bei 37°C im BZ-9000 Mikroskop eingefasst. Die Fluidic Unit wird in einen externen Inkubator gestellt um das Medium warmzuhalten. Der Fluss wird nun gestartet, wobei ein Scherstress von 5 dyn cm^{-2} bei einem Fluss von $3,80 \text{ ml min}^{-1}$ durch einen Druck von 10,1 mbar erzeugt wird.

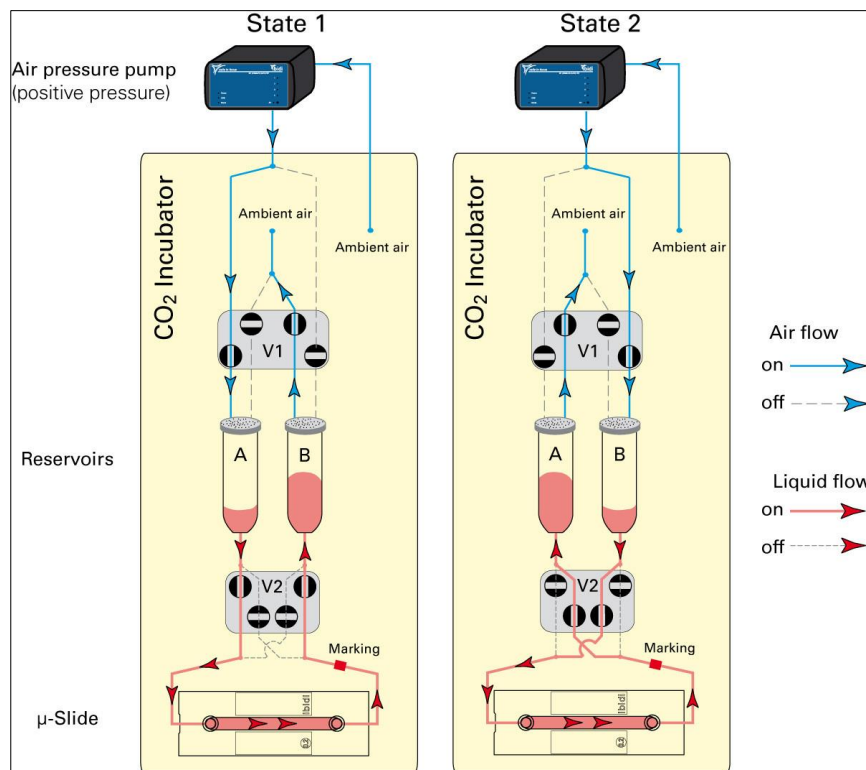


Abbildung 10: Aufbau des Perfusion Sets der Firma IBIDI für Scherfluss-Assays. Es wird sterilfiltrierte Luft in die Reservoirs A und B gepumpt. Durch den Wechsel der Ventilstellungen von State 1 zu State 2 ergibt sich ein unidirektionaler Fluss durch ein μ -slide. Es werden für die im μ -slide befindlichen Zellen mechanische Stimuli und ein homogener Scherstress nahe an physiologischen Bedingungen erreicht. (Abbildung: IBIDI 2018).

Während dieses System equilibriert und die VWF Sekretion stattfindet, wird Konzentrat einer zu untersuchenden ADAMTS13-Variante bei 37°C für 15 min inkubiert. Es erfolgt anschließend eine Zugabe von 100 ng ml⁻¹ ADAMTS13 in die Fluidic Unit. In einem Abstand von 36 sec werden Bildausschnitte fotografiert, die später ausgewertet werden. Erst nach 36 sec wird ADAMTS13 in das Slide geleitet, die ersten Aufnahmen werden als Ausgangszustand aufgenommen. Nach 684 sec und insgesamt 20 Aufnahmen ist ein Versuch beendet.

Die so erhaltenen Bilder werden mithilfe des Programms ImageJ V.1.51J8 ausgewertet. Für die Auswertung wird ein Maßstab von 930 px mm⁻¹ eingestellt.

In jedem der Bilder werden, unter Berücksichtigung der Flussrichtung während des Versuches, 100 VWF Fäden markiert und jeweils die Länge erfasst. Aus der Abnahme der kumulierten Länge der Fäden pro Zeiteinheit ergibt sich eine relative Kinetik der ADAMTS13-Proteaseaktivität. Diese ist zwischen den so untersuchten Varianten vergleichbar und liefert die Grundlage für Erkenntnisse von Struktur-Funktionsbeziehungen von defizienten ADAMTS13-Varianten.

2.14 Aktivitätstest mittels Light transmission aggregometry

Light transmission aggregometry (LTA) ist eine etablierte Methode zur Messung der Plättchenfunktion bei Gerinnungstörungen und gilt als Gold Standard. Mit dieser Methode wird die optische Turbidität gemessen, die sich proportional zur Plättchenaggregation verhält (Hvas und Favaloro 2017).

In diesem Versuch werden gewaschenen Thrombozyten, VWF und Ristocetin in einem Reaktionsgefäß, das mit einem Rührfisch bestückt ist, in einem Aggregometer in Reaktion gebracht. Ristocetin löst eine Bindung von dem VWF an Thrombozyten aus. Nach Zugabe von ADAMTS13 wird eine potentielle Änderung der Trübung gemessen.

Vor der Durchführung des Versuches werden Thrombozyten aus Buffy Coats gereinigt, ohne dass diese aktiviert werden. Buffy Coat ist die zellhaltige Fraktion, die bei Blutplasmaspenden als Abfall anfällt.

Waschen von Buffy Coats

Ca²⁺-freier Tyrode's-Puffer ist ein Puffer zur Aufnahme von Thrombozyten. Der Ca-freie Tyrode's-Puffer wird wie in Tabelle 24 angegeben hergestellt. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 6,5 eingestellt, um die Thrombozyten inaktiv zu halten.

Je 30 ml Buffy Coat werden in zwei 50 ml Tubes überführt und mit Tyrode's-Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Ca-freien Tyrode's Puffers pH = 6,5

Bezeichnung	Menge
NaCL	4,0 g
KCL	0,1 g
HEPES	0,596 g
Dextrose	0,25 g
H ₂ O	Auf 500 ml

Der Ca²⁺-freie Tyrode's-Puffer wird genutzt, um einen Plättchenresuspensionspuffer mit 5 % BSA herzustellen, wie in Tabelle 25 aufgeführt. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 25: Zusammensetzung des Plättchenresuspensionspuffers pH = 7,4

Bezeichnung	Menge
Tyrode's-Puffer	200 ml
BSA	10 g

Eine Menge von 32,5 µl Apyrase wird hinzugegeben was einer Endaktivität von 100 U ml⁻¹ entspricht. Durch Apyrase wird die Plättchenaktivierung unterdrückt. Es folgen mehrere Zentrifugationsschritte. Mit jedem Schritt wird die Zugabe der Apyrase um die Hälfte reduziert.

Zentrifugiert wird jeweils 15 min bei 23 °C und 1589 x g. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird der proteinreiche Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die übrigen Fraktionen werden durch Ca-freien Tyrode's Puffer auf 30 ml aufgefüllt und vorsichtig geschwenkt. Nach dem 3. Waschschrift erfolgt keine Zugabe von Apyrase mehr. Nach 4 Zentrifugationsschritten wird die erhaltene Fraktion auf 40 ml mit Plättchenresuspensionspuffer aufgefüllt und 7 min bei 314 x g zentrifugiert.

Der so erhaltene trübe Überstand enthält nicht aktivierte, gewaschene Plättchen. Mit einem Zellzählgerät (Sysmex) wird die Plättchenzahl bestimmt.

Die plättchenhaltige Suspension wird unmittelbar vor jedem Versuch auf 300×10^3 Plättchen mit Plättchenresuspensionspuffer eingestellt. Mit einem solchen Ansatz ist eine ausreichend reproduzierbare Aggregation von Plättchen möglich, obwohl die Menge und Eigenschaften je nach Spender geringfügig variieren können.

Messung der Plättchenaktivität

Für diese Versuche wird ein CHRONO-LOG® Model 700 Aggregometer verwendet, das die parallele Messung der Aggregation zweier Ansätze unter Scherkräften mittels Messung der Turbidität ermöglicht. Für die Versuche dürfen die Plättchen nicht voraktiviert sein, deswegen wird die Plättchenaktivität zuvor geprüft.

Es wird die Plättchensuspension mit Plättchenresuspensionspuffer verdünnt und mit einem Magnetrührfisch in einer Küvette in das Aggregometer gestellt. Nach einigen Minuten wird 1 mM CaCl₂ dazugegeben. Es wird 5 min observiert, ob das Gerät eine Aggregation anzeigt.

Aggregometrie-Versuche

Der eigentliche Versuch findet in zwei parallelen Ansätzen, wie in Tabelle 26 zusammengefasst, statt. Die Ansätze unterscheiden sich lediglich durch ADAMTS13, die einmal im Wildtyp und zum anderen als missense-Variante in der Konzentration von 1000 ng ml⁻¹ eingesetzt wird.

Zunächst werden die mit Nr.1 bezeichneten Lösungen jeweils mit einem Magnetrührfisch in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt. Es wird in der Software eine Baseline gesetzt, dann wird durch die Zugabe von Ristocetin die Aggregatbildung von VWF und Thrombozyten gestartet. Die Trübung nimmt durch die Bildung von großen Aggregaten nun ab.

Tabelle 26: Versuchsansätze Aggregometrie

Nr	Bezeichnung	Wildtyp	Bezeichnung	p.Pro353Leu
1	Resuspensionspuffer	201,35 µl	Resuspensionspuffer	258,63 µl
1	Plättchensuspension	207,47 µl	Plättchensuspension	207,47 µl
1	1M CaCl ₂	0,50 µl	1M CaCl ₂	0,50 µl
1	wtVWF (11750 %)	4,25 µl	wtVWF (11750 %)	4,25 µl
2	Ristocetin (0,6 ng ml ⁻¹)	15,0 µl	Ristocetin (0,6 ng ml ⁻¹)	15,0 µl
3	wADAMTS13 (7000 ng ml ⁻¹)	71,43 µl	ADAMTS13 p.Pro353Leu (35333 ng ml ⁻¹)	414,15 µl

Nach circa 12 min, wenn sich das System nicht mehr stark verändert, wird durch die Zugabe von ADAMTS13 die Proteolyse von VWF unter Einfluss von Scherkräften gestartet, was zu einer Abnahme von großen Aggregaten und einer erneuten Trübung der Suspension führt.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Immunfluoreszenz dargestellt, die einen Teil der intrazellulären Prozessierung von ADAMTS13 anzeigt. Es folgen die Ergebnisse der Scherfluss-Assays, mit denen die Aktivität von ADAMTS13-Varianten relativ zu wtADAMTS13 gemessen wurden. Abschließend werden die Daten eines Aggregometer-Assays gezeigt, das als Proof of Principle wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt wurde.

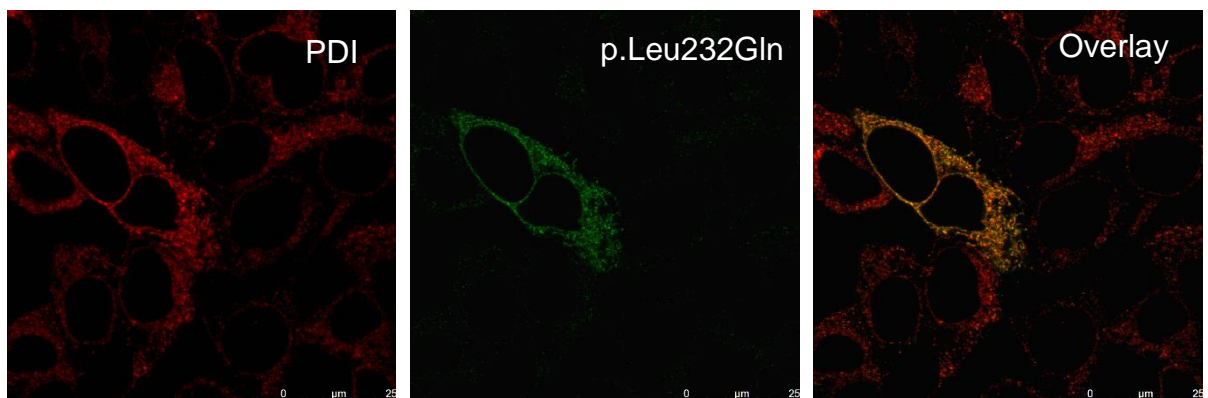
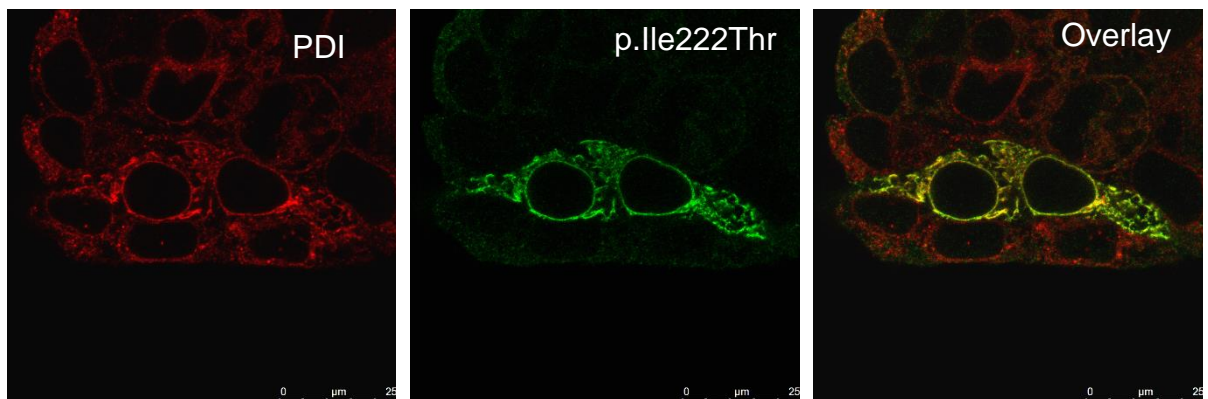
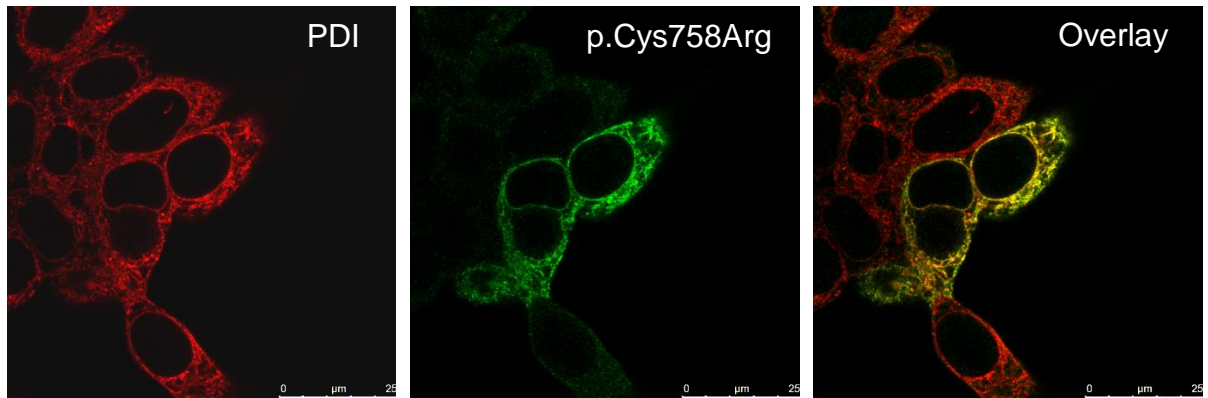
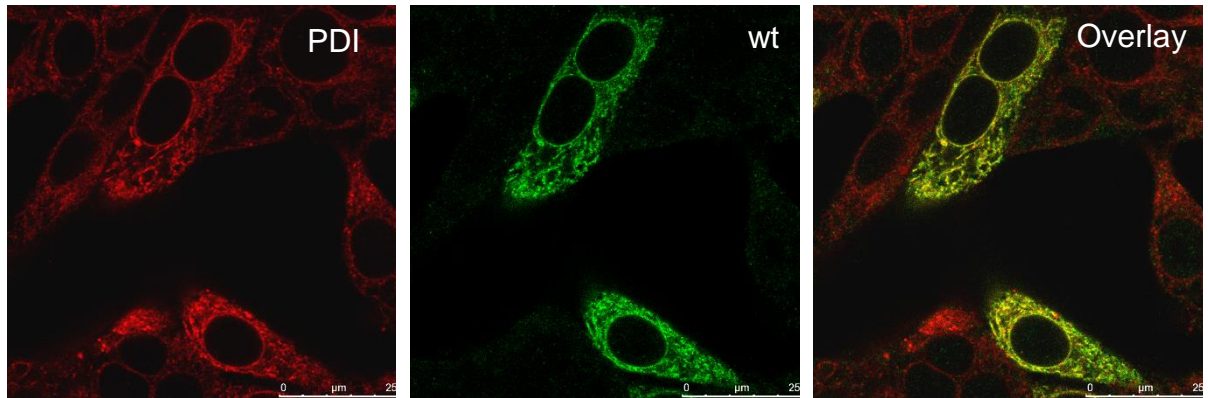
3.1 Intrazelluläre Lokalisation von ADAMTS13-Varianten

Da die untersuchten ADAMTS13-Varianten im Patienten sehr geringe Plasmakonzentrationen aufweisen und ihre stabile Expression in HEK293 Zellen unterschiedlich große extrazelluläre Konzentrationen ergaben, wurde außerdem ihre intrazelluläre Lokalisation untersucht, um Hinweise auf Prozessierungsfehler während der Biosynthese zu erhalten.

Zur Prüfung einer ER-Retention wurden HEK293 Zellen transient mit Expressionsvektoren, die die cDNS der zu untersuchenden ADAMTS13 Varianten enthalten, transfiziert. Nach 48-stündiger Expression wurden die Zellen fixiert und ADAMTS13 und das ER durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Als ER-Markerprotein wurde die Proteindisulfidisomerase PDI genutzt. Die markierten Proteine wurden anschließend mittels eines konfokalen Mikroskops aufgenommen. Der Vergleich der Intensität der Fluoreszenz der sekundären donkey anti-goat AF488 und rabbit anti-mouse AF546 Antikörper lässt jeweils indirekt Rückschlüsse auf die Verteilung und die Menge von ADAMTS13 und PDI im ER zu und es kann die Kolokalisation von ADAMTS13 und PDI gemessen werden (**Abbildung 11**).

Für alle untersuchten ADAMTS13 Varianten ist die Verteilung im ER gleichmäßig. Es gibt keinen Bereich im ER, auf den sich das Protein stark konzentriert.

Ein Overlay der jeweiligen Kanäle lässt qualitativ eine Messung der Kolokalisation von ADAMTS13 zu. Der subjektive Eindruck einer Kolokalisation der beiden Proteine, also gelbe Pixel im Overlay, wird mit einer Software wie in Abschnitt 2.12 beschrieben bestimmt. In Abbildung 12 ist eine repräsentative Auswertung dieser Software dargestellt. Es kann zwischen roten und grünen Pixeln ein Pearson's R Koeffizient von 0,96 einer linearen Regression mit der Steigung 0,96 ermittelt werden. Diese Auswertung bestätigt den subjektiven Eindruck einer Kolokalisation von PDI und ADAMTS13 im ER.



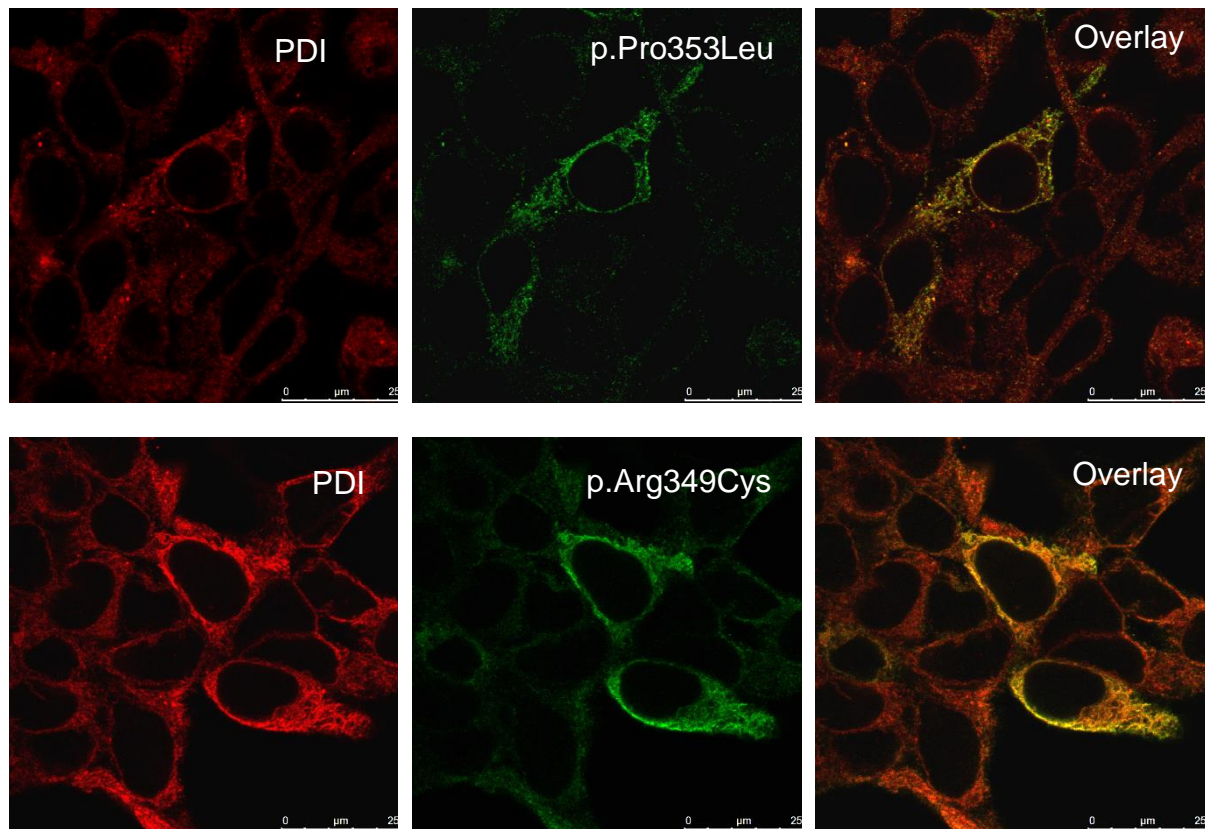


Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von ADAMTS13 und PDI. HEK293 Zellen wurden transient mit cDNS von ADAMTS13 Varianten p.Cys758Arg, p.Ile222Thr, p.Leu232Gln, p.Pro353Leu, p.Arg349Cys, sowie dem Wildtyp transfiziert. Nach 48 h Expression wurden die Zellen fixiert und ADAMTS13 und PDI (ER-Markerprotein) durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die genutzten Antikörper sind goat anti-ADAMTS13 und mouse anti-PDI Antikörper als Erstantikörper und donkey anti-goat AF488 und rabbit anti-mouse AF546 als Zweitantikörper. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Leica SP5) mit einem HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV Objektiv. Bildgröße ist 1024 x 1024 px. Die Laserstärke wurde auf 11 % für den 561 Laser und 26 % für 488 Laser eingestellt. Es ist jeweils eine representative Zelle dargestellt, bei der die Kolokalisation von ADAMTS13 und PDI in den Overlays gelb erkennbar ist. Der Balken entspricht 25 µm. Der Kontrast der Bilder wurde in dieser Darstellung nachträglich für bessere Sichtbarkeit erhöht.

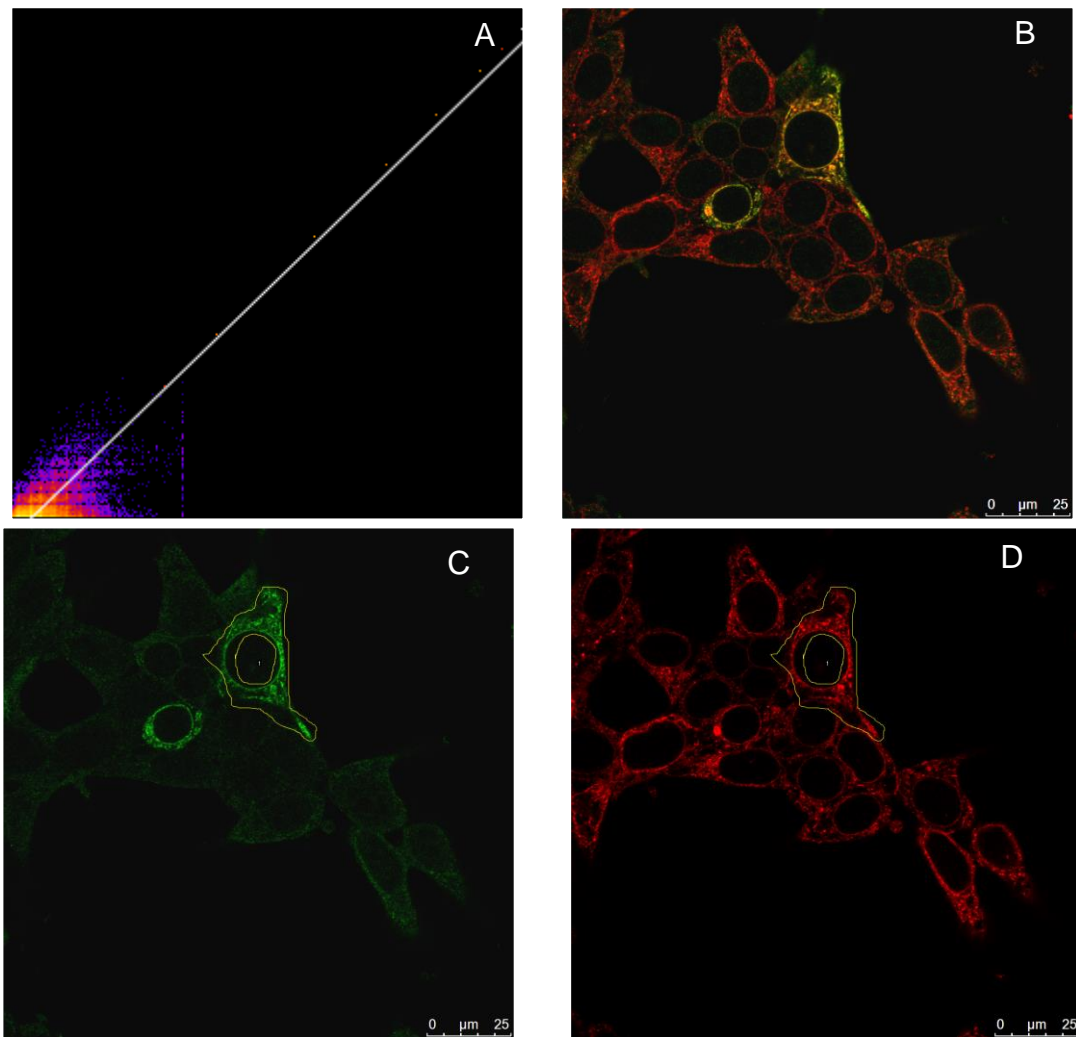


Abbildung 12: (A) 2D Histogramm der Intensität von Pixeln aus dem roten und grünen Kanal eines Immunfluoreszenz-Scans der ADAMTS13 Mutante p.Cys758Arg in HEK293 Zellen. Die Zellen wurden behandelt, wie im vorherigen Abschnitt erläutert. Der ermittelte Pearson's R Koeffizient einer linearen Regression der Verteilung roter und grüner Pixel mit der Steigung 0,96 ergab einen Wert von 0,96. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software ImageJ. (B) Overlay des roten und grünen Kanals (C) In Gelb sieht man die ROI im grünen Kanal, die für die Messung von Kollokalisation genutzt wurde. (ADAMTS13) (D) roter Kanal (PDI)

3.2 ADAMTS13 Aktivität in Scherfluss-Assays

In der Arbeitsgruppe von Dr. Brehm und Prof. em. Schneppenheim wurden in den letzten Jahren 17 ADAMTS13-Varianten unter statischen Bedingungen untersucht. Da die Aktivität von ADAMTS13 aber scherabhängig ist, erfolgt nun die Messung der Proteaseaktivität dieser ADAMTS13-Varianten unter Flussbedingungen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teil der in der Veröffentlichung untersuchten Varianten, die noch ausreichend hohe residuale Sekretion aufweisen (p.Leu232Gln, p.Arg349Cys, p.Pro353Leu und p.Pro671Leu) sowie zwei neue, kürzlich identifizierte Varianten (p.Ile222Thr und p.Cys758Arg) untersucht.

Hierfür wurde ein Scherfluss-Assay genutzt, der von der Gruppe entwickelt wurde (Kraus et al.). Wie in Abschnitt 2.13 ausführlich beschrieben, werden HUVEC-Zellen, innerhalb eines künstlichen Blutgefäßsystems mit Histamin zur Sekretion von VWF-Fäden auf ihrer Oberfläche angeregt, die dann als Substrat für die ADAMTS13-Varianten dienen. Die Reduktion der Gesamtlänge von 100 VWF-Fäden nach Zugabe von ADAMTS13 wird mittels Zeitreihenaufnahmen observiert. (**Abbildung 13**) Die gelb markierten Bereiche umranden VWF-Fäden, der innerhalb von 360 sec nach Zugabe von ADAMTS13 in seiner Länge abnimmt. Die roten Pfeile markieren abgebaute VWF-Fäden, schwarze Pfeile bezeichnen VWF-Fäden.

In **Anhang 1** ist ergänzend eine weniger aktive Variante dargestellt.

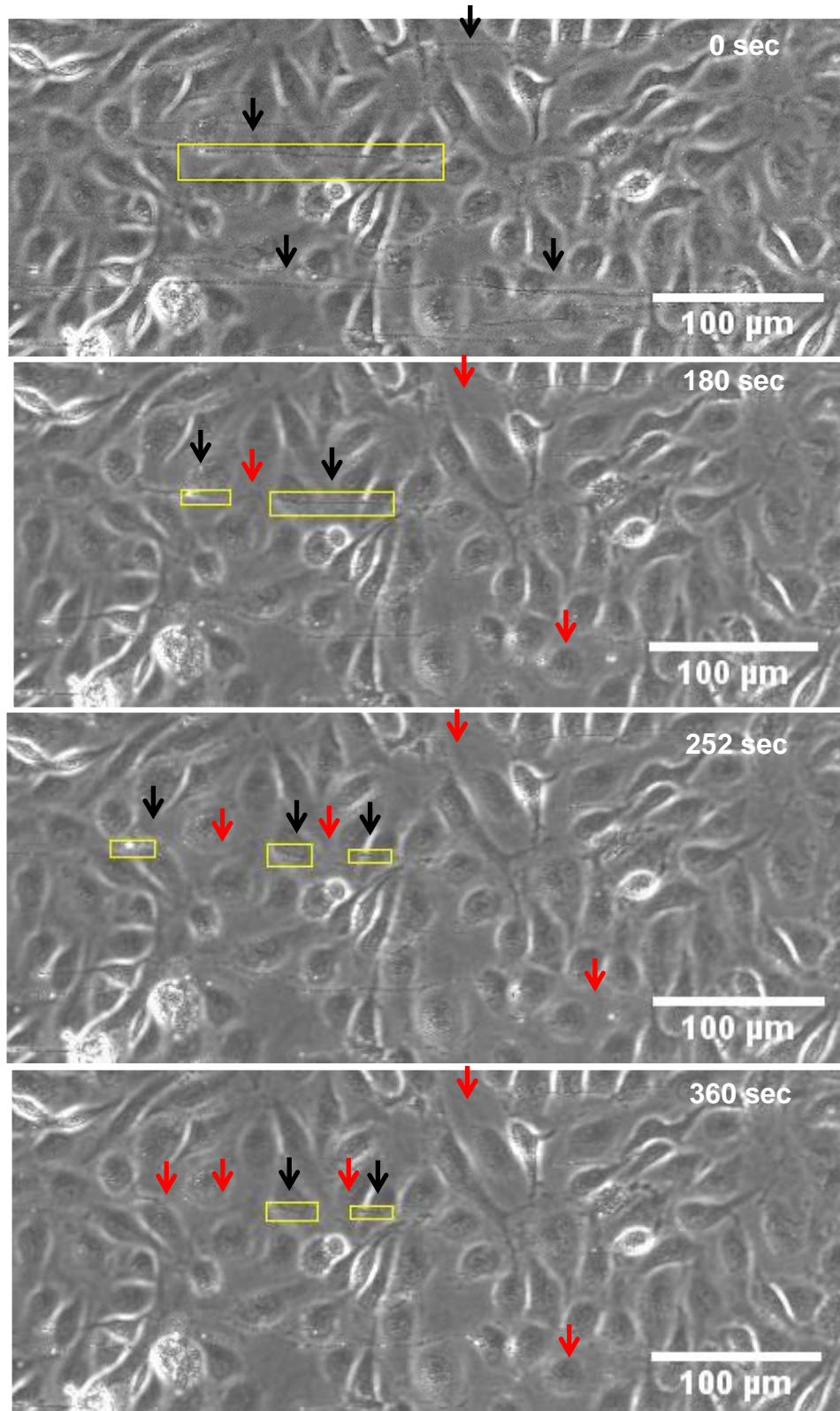


Abbildung 13: Proteolytischer Abbau von VWF-Fäden durch wtADAMTS13 in einem Scherfluss-Assay Dargestellt sind HUVEC-Zellen, die über Nacht in einem 0,4 µ-Slide (IBIDI) kultiviert und dann mit Histamin unter einem Scherfluss von 5 dyn cm^{-2} zur Sekretion von VWF angeregt wurden. Im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 bei 20x Vergrößerung sind VWF-Fäden zu erkennen, die durch GPIIb α -Latexkügelchen markiert wurden. Die Bildreihe verdeutlicht, wie die Fäden nach der Zugabe von 100 ng ml^{-1} wtADAMTS13 in Anzahl und Länge abnehmen. Ein Bereich mit einem VWF-Faden, der innerhalb von 360 sec abgebaut wird, ist gelb markiert. Die roten Pfeile markieren abgebaute VWF-Fäden, schwarze Pfeile bezeichnen VWF-Fäden.

In **Abbildung 14** ist die Abnahme von VWF-Multimeren durch den Wildtyp von ADAMTS13 im Vergleich zur Abnahme durch die Variante p.Ile222Thr dargestellt. Hier ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf zwischen dem Wildtyp und der Variante p.Ile222Thr sowie der Variante Cys758Arg vorhanden.

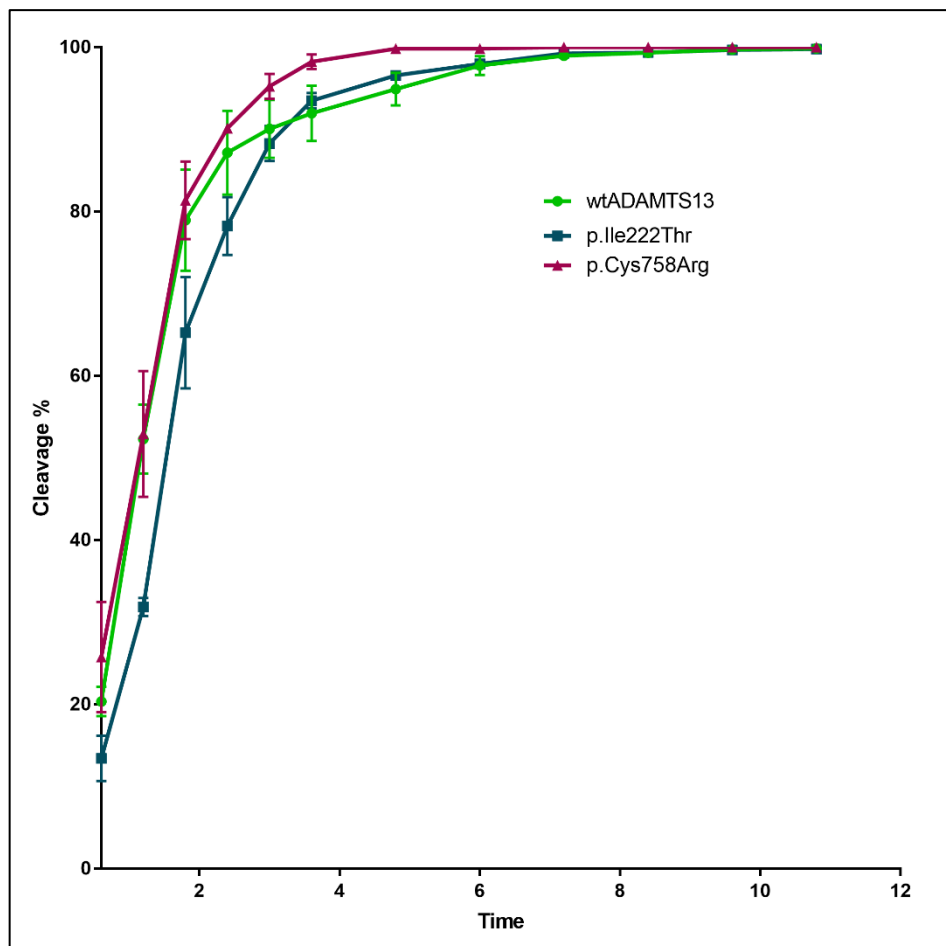


Abbildung 14: Prozentuale Zunahme der Proteolyse (Cleavage) von VWF-Fäden durch ADAMTS13-Varianten unter Fluss.

Adhärente HUVEC-Zellen in einem Flusskanal wurden mit Histamin zur Sekretion von VWF-Fäden angeregt, die Fäden mittels GPIb-Latexkügelchen markiert und ADAMTS13-Varianten p.Ile222Thr (cyan), p.Cys758Arg (rot) bzw. wtADAMTS13 (gelb) zugegeben. Die Reduktion der VWF-Fäden wurde mittels Zeitreihenaufnahmen alle 36 sec observiert. Anschließend wurden die Gesamtlänge von 100 VWF-Fäden für jeden Zeitpunkt mit der ImageJ Software gemessen und die prozentuale Zunahme der Längenreduktion durch Proteolyse (Cleavage) berechnet und hier gegen die Zeit aufgetragen. Angegeben sind Mean \pm SEM für jeweils drei unabhängige Versuche. Der erste gemessene Wert ist nicht dargestellt, da er kein echter Nullwert ist, weil ADAMTS13 in den ersten 36 sec langsam in den Kanal einläuft (siehe Methoden Abschnitt 2.13).

In **Abbildung 15** sind die übrigen gemessenen ADAMTS13-Varianten zusammen mit dem Wildtyp dargestellt. Die Varianten zeigen relativ zu wtADAMTS13 reduzierte proteolytische Aktivität, wobei sich auch zwischen den Varianten teilweise signifikante Unterschiede ergeben.

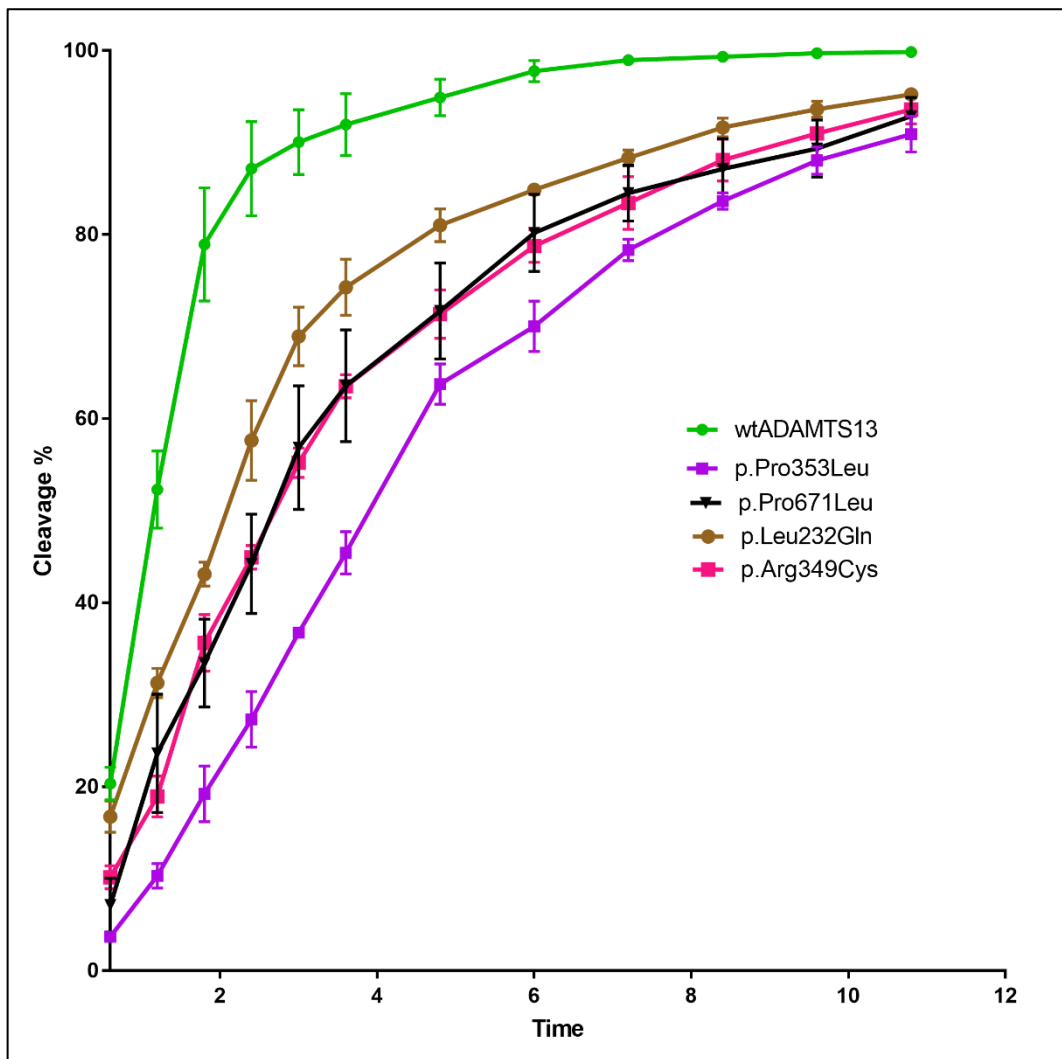


Abbildung 15: Darstellung der relativen Abnahme der VWF-Länge über einen Zeitraum von 10 min. Es wurden jeweils in unabhängigen Triplikaten die Varianten der p.Cys758Arg, p.Leu232Gln, p.Pro353Leu, p.Arg349Cys sowie dem Wildtyp untersucht. Es zeigen sich zwischen den Varianten signifikante Unterschiede in der Proteaseaktivität, die sich auf die Punktmutationen zurückführen lassen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler auf den Mittelwert. Der erste Wert ist nicht dargestellt, da ADAMTS14 in den ersten 36 sec noch nicht im Slide ist.

Um die Unterschiede in der Aktivität der ADAMTS13-Varianten zu veranschaulichen, wird in **Abbildung 16** die prozentuale Cleavage-Rate nach 2,4 min dargestellt. Die Differenzen wurden mit einem Students` T-Test auf statistische Signifikanz untersucht und die p-Werte in Tabelle 27 aufgelistet. Außer für p.Ile222Thr und für Cys758Arg sind für alle untersuchten ADAMTS13-Varianten eine signifikante Reduktion der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Es wurde anhand der Steigung der ADAMTS13-Cleavage zwischen 36 und 72 sec weiterhin die initiale Aktivität der ADAMTS13-Varianten bestimmt, die als Kennwert einen Vergleich der Aktivitäten ermöglicht. So erreicht die Variante p.Pro353Leu lediglich 20% der initialen Aktivität des Wildtyps.

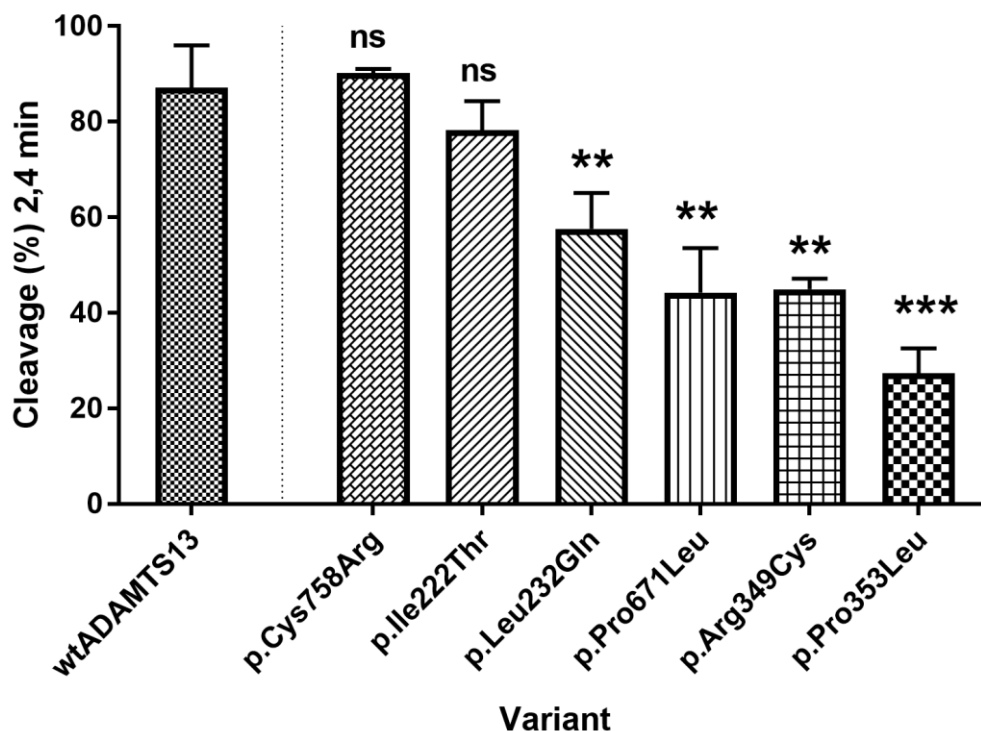


Abbildung 16: Mittelwert der VWF-Cleavage durch ADAMTS13 Varianten nach 2,4 min. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale VWF-Cleavage durch die angegebenen ADAMTS13-Varianten nach 2,4 min aus den in Abbildung 14 und 15 gezeigten Flussversuchen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler auf den Mittelwert. Mittels Zweistichproben-t-Test wurde die Signifikanz der Differenzen geprüft. (n = 3 ns = nicht signifikant P < 0,05 [*], P < 0,01 [**] und P < 0,001 [***]).

Tabelle 27: Signifikanzen der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 gegen Varianten von ADAMTS13, die mittels Zweistichproben-t-Test berechnet wurden

wtADAMTS13 vs. Varianten	P-Wert
p.Arg349Cys	0,0013
p.Pro353Leu	0,0005
p.Pro671Leu	0,0045
p.Ile222Thr	0,2238
p.Leu232Gln	0,0046
p.Cys758Arg	0,5932

Tabelle 28: Initiale Aktivitäten der ADAMTS13-Varianten in % Cleavage per min und ng ml⁻¹.

ADAMTS13	Initiale Aktivität
wtADAMTS13	0,887
p.Pro353Leu	0,184
p.Pro671Leu	0,458
p.Ile222Thr	0,512
p.Leu232Gln	0,404
p.Arg349Cys	0,244
p.Cys758Arg	0,755

3.3 ADAMTS13 Aktivität im Aggregometer Assay

Der unter 3.21. beschriebene Flussassay simuliert die Situation, in der am Endothel oder Subendothel verankerte VWF-Fäden durch ADAMTS13 gespalten werden. Um zusätzlich einen Assay zu etablieren, in dem die Proteolyse von VWF in der Zirkulation simuliert werden kann, wurde hier untersucht, ob Light Transmission Aggregometry (LTA) für diese Anwendung geeignet ist. Aus Zeitgründen konnte nur ein präliminärer Versuch durchgeführt werden. Dazu wurden VWF und inaktive, gewaschene Thrombozyten zunächst durch die Zugabe von Ristocetin vernetzt, was eine Aggregation von VWF und Thrombozyten zur Folge hat. Ristocetin ist ein Antibiotikum, dass zur Aktivierung der A1-Domäne führt, wodurch VWF an Thrombozyten binden kann. Die zunächst trübe Suspension wird dadurch klar. Die Senkung der Trübung (Turbidität) konnte erfolgreich mittels LTA gemessen werden (Abfall der Kurve in **Abbildung 17**).

Nach Zugabe von wtADAMTS13 werden die Aggregate wieder aufgelöst, was eine erneute Trübung der Suspension zur Folge hat (Steigen der Kurve in **Abbildung 17**).

Die aufgenommenen Daten der Aggregation von VWF und ADAMTS13 und der Proteolyse durch ADAMTS13 werden ab dem jeweiligen Zeitpunkt der Ristocetin Zugabe auf 100 % und den Mittelwert normiert, der sich vor der ADAMTS13 Zugabe einpendelt, wie in **Abbildung 17** dargestellt.

Nach 45 min ist im Plot ein Unterschied im Verlauf der Turbidität gut sichtbar. Der Mittelwert der Turbidität zwischen 31-32 min wird gewählt, um den Unterschied zu quantifizieren.

In **Abbildung 18** sind die normierten Mittelwerte der Turbidität zwischen 3-12 min und 31-32 min nach Zugabe von ADAMTS13 von wtADAMTS13 und p.Pro353Leu gegenübergestellt. Durch diese Normierung können Unterschiede der Stärke der Aggregation, die je nach Alter der Plättchen verschieden sein kann, ausgeglichen. Die Originalwerte sind tabellarisch im **Anhang 2** zusammengefasst. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen p.Pro353Leu und wtADAMTS13 vorhanden. Der Wildtyp hat nach 45 min die Aggregatgröße um etwa 50 % reduziert, die Variante p.Pro353Leu dagegen nur um etwa 10 %.

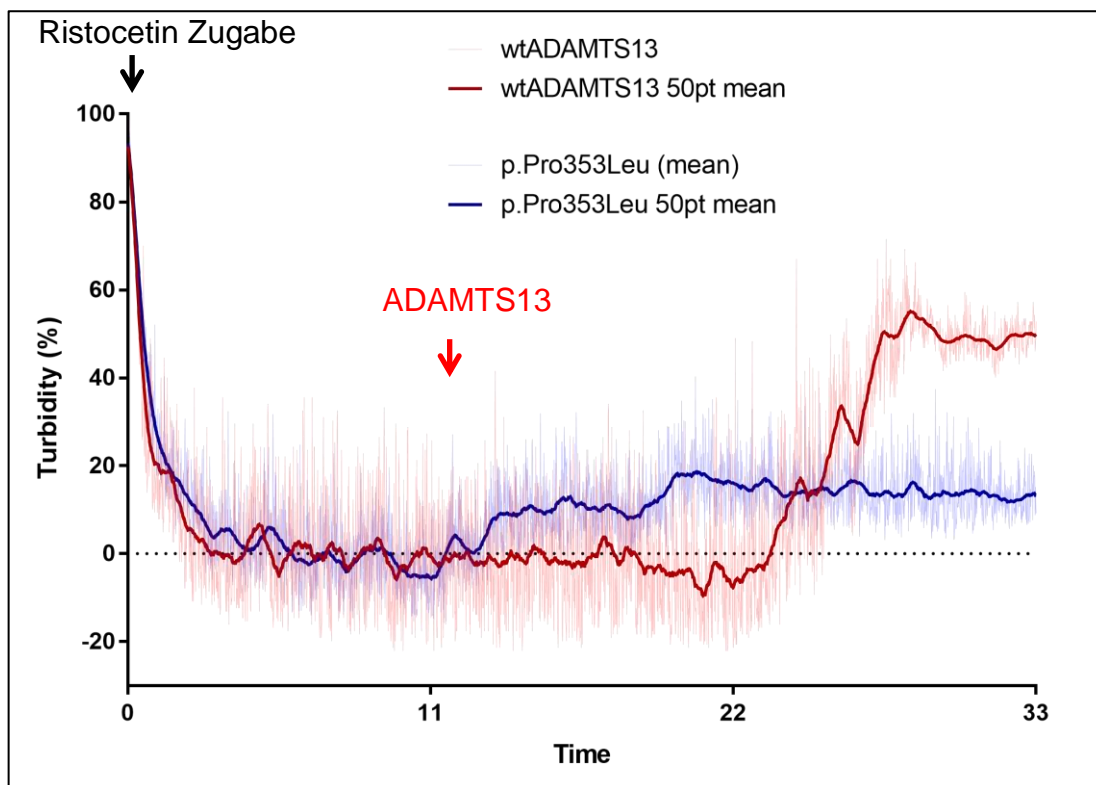


Abbildung 17: Verlauf der Aggregatbildung von VWF und Thrombozyten nach Zugabe von Ristocetin und ADAMTS13. In einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer wurde zunächst die Aggregatbildung zwischen VWF und inaktiven, gewaschenen Thrombozyten durch die Zugabe von Ristocetin (schwarzer Pfeil) initiiert. Nach 12 min wurden wtADAMTS13 (rot) bzw. p.Pro353Leu (blau) hinzugegeben (roter Pfeil). Der Kurvenverlauf gibt die Turbidität über einen Zeitraum von 33 min wieder. Der Wildtyp wurde einmal gemessen, die Mutante ist als Mittelwert einer Dreifachbestimmung dargestellt. Die transparent dargestellten Messwerte wurden mit den Mittelwert der Messwerte zwischen 3-12 min und 100 % ab Zeitpunkt der Ristocetin Zugabe normalisiert. Dazu dargestellt sind Mittelwerte über 50 Messwerte, durch die ein Polynom 6. Ordnung gezogen ist.

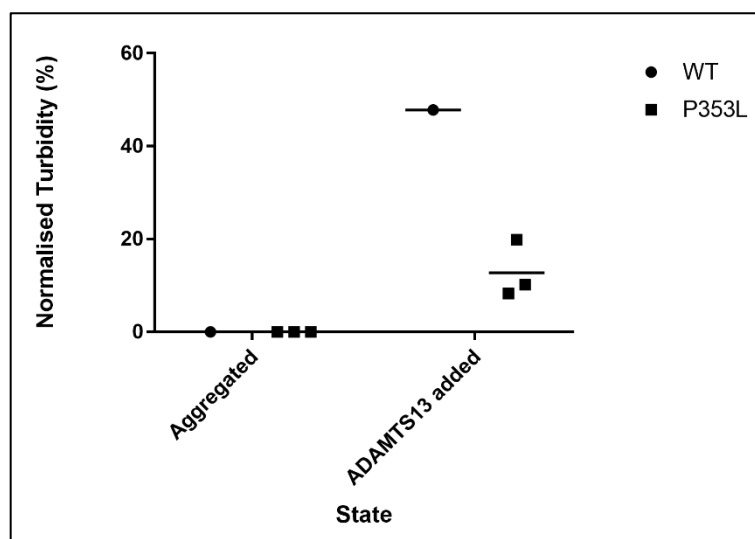


Abbildung 18: Die Mittelwerte der normalisierten Turbidität vor und nach Zugabe von wtADAMTS13 und p.Pro353Leu. Die Mittelwerte zwischen 3-12 min wurden normiert und die Mittelwerte der normierten Werte zwischen 31-32 berechnet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von mehreren ADAMTS13-Varianten in Scherfluss-Assays gemessen und verglichen. Die Varianten zeigen in diesen Assays, obwohl sie in an USS erkrankten Patienten vorhanden waren, stark ausgeprägte Restaktivität. Die intrazelluläre Lokalisation dieser Varianten wurde mittels Immunfluoreszenz bestimmt, um Hinweise auf Prozessierungsfehler während der Biosynthese zu erhalten. Die Aufnahmen zeigten bei allen ADAMTS13-Varianten eine ähnliche Intensität und gleichmäßige Verteilung im ER.

Abschließend wurde getestet, ob die ADAMTS13-Aktivität mittels eines Aggregometer-Assays gemessen werden kann. Als Ergebnis ist zu diesem Versuch im vorherigen Abschnitt ein messbarer Unterschied zwischen wtADAMTS13 und einer ADAMTS13-Variante dargestellt.

Die Zusammenhänge dieser Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Lokalisation von ADAMTS13 Varianten

Ein Vergleich der Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten PDI und ADAMTS13 zeigen eine Kolo­kalisierung von PDI und ADAMTS13. PDI ist ein Chaperon, das im ER lokalisiert ist. Die Markierung wird hier genutzt, um die Lokalisation von ADAMTS13 im ER zu zeigen. Es ist möglich, dass ADAMTS13 auch mit PDI interagiert, generell ist Kolo­kalisierung aber kein hinreichender Nachweis einer direkten Interaktion. Dies müsste über weitere Methoden bestätigt werden. Geeignet wären dafür z.B. Elisa, Fluorescence Correlation Spectroscopy oder Microscale Thermophoresis wie für die Interaktion von PDI und VWF beschrieben (Lippok et al. 2016).

Die im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen stärkere Intensität von roter Fluoreszenz in transfizierten Zellen spricht für einen Stress im ER, der auf die starke Überexpression der ADAMTS13-Varianten zurückgeht, denn es wurde beschrieben, dass die PDI-Expression bei ER-Stress durch die Unfolded Protein Response ansteigt (Osłowski und Urano 2011). Die gleichmäßige Verteilung von wtADAMTS13 und allen Varianten weist nicht auf eine Retention im ER hin. Zu diesem Schluss kam auch Hassenpflug et al. (2018) bei Fluoreszenzaufnahmen ADAMTS13 p.Leu232Gln, p.Arg1034* und p.Trp390Cys im Vergleich mit dem Wildtyp.

Für die Variante p.Trp390Ala wurde von Ling et al. eine ER-Retention nachgewiesen, die bei dieser Variante zu einer verringerten Sekretion führt. Als Expressionssystem wurden hier allerdings HeLa-Zellen verwendet.

Underwood et al. (2016) stellten zwischen wtADAMTS13 und einer Mutante, die transient in HEK293 Zellen exprimiert wurden, ebenfalls eine Lokalisation im ER fest. Sie stellten weiterhin eine Lokalisation beider Proteine im *cis* Golgi fest, die aber für die Mutante reduziert ausfiel. Für die untersuchte Variante von ADAMTS13 konnte Underwood et al. einen intrazellulären Abbau durch das Proteasom nachweisen, die wtADAMTS13 nicht betrifft. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der im Zytosol die Hydrolyse von durch Ubiquitin markierten Proteinen ausführt (Will 2014).

Die in dieser Arbeit untersuchten Varianten könnten auch auf diesen Zusammenhang untersucht werden. Würde der intrazelluläre Abbau von ADAMTS13 an dieser Stelle gezielt verhindert, könnte das als Ansatzpunkt genommen werden, eine Strategie zu entwickeln, um die Stärke der Sekretion von restaktiven ADAMTS13-Varianten zu erhöhen.

Die bei der Proteinproduktion festgestellten Konzentrationen aus Tabelle 29 von sekretierten ADAMTS13-Varianten lassen demnach nur bedingt den Schluss zu, dass auch im Patienten eine Sekretion so reduziert erfolgt.

Die bei der Proteinproduktion festgestellten Sekretionsstärken von ADAMTS13-Varianten sind in Tabelle 29 dargestellt. Es ist bei p.Ile222Thr und p.Leu232Gln eine deutliche Verringerung der Sekretionsstärke festgestellt worden. Für die Variante p.Pro353Leu ist die Sekretionsstärke Hassenpflug et al. 2018 entnommen worden.

Tabelle 29: Stärke der Sekretion der verschiedenen ADAMTS13 Varianten in HEK293 Zellen.
* Daten zur Sekretion nach Hassenpflug et al. 2018

ADAMTS13 Variante	Sekretion
p.Ile222Thr	-
p.Cys758Arg	++
p.Leu232Gln	+*
p.Arg349Cys	++*
p.Pro353Leu	+*
p.Pro671Leu	+*
wtADAMTS13	+++

Die transiente und stabile Transfektion lassen nicht direkt Schlüsse auf die Sekretion in Patienten zu, denn bei der transienten Transfektion sind alle Zellen der gleiche Menge DNS ausgesetzt, bei der stabilen wird das Plasmid mit variierender Effizienz

ins Genom eingebaut. Des Weiteren sind die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit cDNS durchgeführt worden. Durch das Fehlen der Introns sind Mechanismen nicht abgebildet, die die Expression von ADAMTS13-Varianten verhindern könnten, wie etwa Nonsense Mediated Decay der mRNA.

HEK293 Zellen sind als Expressionssystem nicht direkt mit den Endothelzellen im Patienten zu vergleichen, erstere zeichnen sich durch eine robustere Expression aus.

4.2 Proteaseaktivität der ADAMTS13-Varianten

Die Proteaseaktivität von ADAMTS13-Varianten wurde in dieser Arbeit mittels eines Scherfluss-Assays untersucht. Dabei wurden HUVEC-Zellen in einer mit gelantinebeschichteten Flusskammer kultiviert, in der physiologische Scherkräfte simuliert werden, wie sie im Blutfluss vorkommen. Die Zellen wurden mit Histamin zur Sekretion von VWF stimuliert, der lange, stabile Multimere bildet. Diese Multimere wurden mit GPIIb α -beads unter einem Lichtmikroskop sichtbar gemacht. Nach der Zugabe von ADAMTS13-Varianten werden die VWF-Fäden in kleinere Multimere geschnitten. Die Reduktion der VWF-String-Länge wurde mit Zeitreihenaufnahmen 10 min lang dokumentiert und im Anschluss gemessen. Die observierten Proteaseaktivitäten der Varianten werden hier in Bezug auf den Ort der geänderten Aminosäure (AS) (**Abbildung 19**) und die potentiellen Auswirkungen auf ihre Aktivität hin diskutiert.

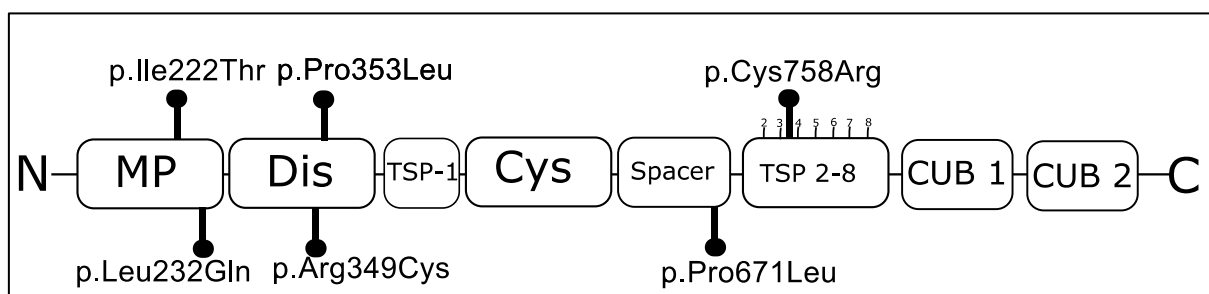


Abbildung 19: Position der Punktmutationen der in dieser Arbeit untersuchten ADAMTS13-Varianten in schematischer Proteinorganisation.

Die Variante ADAMTS13 **p.Ile222Thr** ist bisher noch nicht beschrieben worden. Bei der Patientin lag diese Mutation gemischt heterozygot zusammen mit der Mutation p.Cys.1275.X vor (persönliche Mitteilung von PD Dr. rer. nat. Maria A. Brehm 2018).

Die Patientin zeigte starke Symptome einer USS mit Nierenversagen. Die Position p.Ile222Thr liegt in der MP Domäne zwischen der Ca²⁺ bindenden Stelle und der katalytischen Domäne. Aus einer Beeinflussung der Ca²⁺ bindenden Stelle resultiert laut Crawley et al. 2011 keine ausschlaggebende Reduktion der Aktivität von

ADAMTS13. Der Austausch von der unpolaren AS Isoleucin durch die polare AS Threonin könnte aber durch einen Einfluss der benachbarten katalytische Domäne einen Einfluss auf die Aktivität von ADAMTS13 haben. In den Ergebnissen der dynamischen Assays hat p.Ile222Thr eine Aktivität, die nicht signifikant von wtADAMTS13 abweicht. Da die Patientin schwer betroffen war, ist die Erkrankung mit einer sehr geringen Sekretion beider Mutanten p.Ile222Thr und p.Cys.1275.X zu erklären, wie sie auch in HEK293 Zellen während dieser Arbeit aufgefallen ist.

Die Variante ADAMTS13 **p.Leu232Gln** in der MP-Domäne wurde bereits von Schneppenheim et al. (2003) beschrieben. Der betroffene Patient hatte diese Mutation homozygot und zeigte einen starken Phänotyp mit Nierenversagen und den Symptomen, die auf einen Schlaganfall hinweisen. Von Hassenpflug et al. 2018 wurde diese Variante von ADAMTS13 in HEK293 Zellen hergestellt, wobei eine etwas reduzierte Sekretion festgestellt wurden. Für im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Protein dieser Variante wurde eine circa 10-fach reduzierte Sekretion festgestellt.

Die Aktivität dieser und weiterer ADAMTS13-Varianten wurde von Hassenpflug et al. 2018 mittels eines statischen Assays gemessen. In diesem Assay werden VWF und ADAMTS13-Varianten mit 1,5 M UREA bei 37°C inkubiert. Durch das chaotrope Salz lässt sich die A2-Domäne öffnen, was die Proteolyse durch ADAMTS13 ermöglicht. Im Vergleich zu dem dynamischen Assay wird also unphysiologisch denaturierter VWF verwendet. In einer anschließenden Multimeranalyse wird die Aktivität in einem Agarosegel festgestellt. Für die Variante p.Leu232Gln wurde in einer solchen Analyse eine stark reduzierte Aktivität festgestellt.

In den in dieser Arbeit dynamisch erhobenen Aktivitäten von p.Leu232Gln wurde lediglich eine Reduktion der Aktivität von etwa 30 % relativ zu wtADAMTS13 festgestellt. Die observierten Unterschiede der Ergebnisse zwischen dem statischen und dem dynamischen Assay zeigen, dass das dynamische Assay durch die Eigenschaften, die näher an den tatsächlichen physiologischen Vorgängen liegen, genauere Ergebnisse liefern.

Die hier gemessene Restaktivität zusammen mit der reduzierten Sekretion in HEK293 Zellen deuten darauf hin, dass auch im Patienten die Symptome durch eine beschränkte Sekretion, nicht nur durch eine verringerte Aktivität verursacht werden. Der Austausch der unpolaren AS Leucin durch die polare AS Glutamin an der Stelle 232 im Protein ist in räumlicher Nähe zu His234, das in der katalytischen Domäne mit anderen Histidinen zusammen das Zn²⁺ Ion koordiniert. Es ist also wahrscheinlich,

dass eine Mutation an dieser Stelle die Affinität zum zweiwertigen Ion beeinflusst, was wiederum die proteolytische Aktivität von ADAMTS13 beeinflusst.

Die Mutante ADAMTS13 **p.Arg349Cys** zeigte in dieser Arbeit eine etwas reduzierte Sekretion, wie sie auch von Hassenpflug et al. 2018 festgestellt wurde. Der Patient litt an einem schweren Phänotyp, der bereits neonatal einsetzte. Im dynamischen Assay zeigt diese Variante eine um 45 % reduzierte Aktivität gegenüber wtADAMTS13, während im statischen Assay von Hassenpflug et al. keine signifikante Restaktivität festgestellt wurde. Die starke Reduktion der Aktivität kann im Kontext einer Interaktion des positiv geladenen Arg³⁴⁹ in der Dis Domäne mit der negativ geladenen VWF Asp¹⁶¹⁴ gesehen werden, die als kritisch für den Schneidevorgang von VWF durch ADAMTS13 beschrieben wird, wie in

Abbildung 20 dargestellt ist (de Groot et al. 2009).

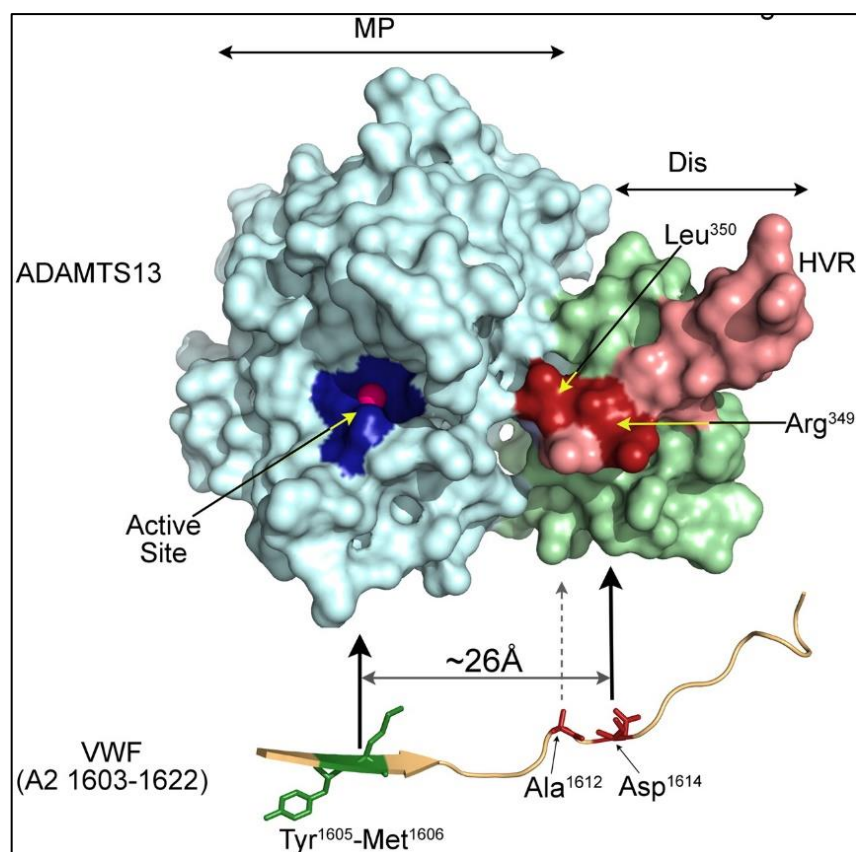


Abbildung 20: MP und Dis Domäne von ADAMTS13 in der Interaktion mit VWF. Arg³⁴⁹ in der Dis Domäne interagiert in einem für die Proteolyse kritischen Schritt mit Asp¹⁶¹⁴ in VWF. Die Mutation p.Arg349Cys hat möglicherweise einen Einfluss auf diese Interaktion, womit eine Reduktion der Aktivität einhergeht. (Abbildung: de Groot et al. 2009)

Die Interaktion bringt die schneidbare Region von VWF in unmittelbare Nähe des katalytischen Zentrums von ADAMTS13. Die Variante ADAMTS13 p.Arg349Ala zeigte

bei de Groot et al. (2009) in einem statischen Assay eine 20-fach reduzierte Aktivität. Es ist denkbar, dass eine Änderung des basischen Arginins hin zum schwach polaren Cystein bei ADAMTS13 p.Arg349Cys aufgrund desselben Mechanismus eine Reduktion der Aktivität zufolge hat, die aber weniger stark ausgeprägt ist.

Die Variante ADAMTS13 **p.Pro353Leu** kennzeichnet ein Austausch der unpolaren AS Prolin durch das ebenfalls unpolare Leucin in der Dis-Domäne von ADAMTS13. Eine gemischt heterozygot mit p.Arg910* betroffene Patientin war von einem starken Phänotyp mit neonatalen Ausbruch betroffen. Bei ihr war keine ADAMTS13-Aktivität messbar. Von einem männlichen Patienten ist ein milder Phänotyp mit <6 % Restaktivität beschrieben, der gemischt heterozygot zusammen mit der Duplikation p.Glu1382Argfs*6 betroffen war. (Hassenpflug et al. 2018)

In dieser Arbeit ergab sich als Aktivität im Scherfluss-Assay für diese Variante eine um 66 % reduzierte Aktivität. Auch Hassenpflug et al. (2018) stellten für diese Variante nur sehr geringe Restaktivität in statischen Assays zusammen mit reduzierter Sekretion fest. Auch hier ist eine Einschränkung der Interaktion von ADAMTS13 mit VWF analog zu p.Arg349Cys möglich. Die Nähe zu der mit VWF D1614 interagierenden AS in ADAMTS13 könnte die Ausrichtung der katalytischen Domäne einschränken.

Die Variante ADAMTS13 **p.Pro671Leu** liegt in der Spacer Region von ADAMTS13. Auch diese Region ist, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, an der Interaktion zwischen VWF und ADAMTS13 direkt beteiligt. Wird die Spacer Region entfernt, führt dies zum Verlust der Proteolytischen Aktivität *in vitro* (Zheng et al. 2003).

Hassenpflug et al. (2018) stellten für diese Variante eine reduzierte Sekretion und Aktivität in statischen Assays fest. Phänotypisch zeigte dieser Patient lediglich milde Symptome, hatte aber gemischt heterozygot noch die Frameshift-Mutation c.4143dupA, welche nicht sekretiert wird (Di Cera 2011). Die in dieser Arbeit im Scherfluss gemessene Aktivität von ADAMTS13 p.Pro671Leu ist gegenüber wtADAMTS13 um 45 % reduziert

Die Variante ADAMTS13 **p.Cys758Arg** ist ein USS auslösender Polymorphismus in der 3. TSR-Domäne mit <5 % Aktivität in humanem Plasma (Shelat et al. 2005). Die Mutation ist erstmals gemischt heterozygot in einer französischen Familie beschrieben. Dabei litten Geschwister trotz gleichen Genotyps an unterschiedlich starker USS (Veyradier et al. 2004). In den Scherfluss-Assays wurde eine Aktivität ähnlich zu wtADAMTS13 gemessen.

Der Polymorphismus liegt an der Stelle eines Codons zur O-Fucosylierung, das putativ durch die Mutation beeinträchtigt wird. Shelat et al. (2005) zeigte, dass durch eine Beeinträchtigung der O-Fucosylierung in den TSR Domänen von ADAMTS13 die Sekretion eingeschränkt wurde. Die Fucosylierungen unterstützen möglicherweise den komplexen Faltungsprozess von ADAMTS13 (Shelat et al. 2005). Für diese ADAMTS13-Variante wird der Phänotyp also wahrscheinlich hauptsächlich durch die geringe Sekretion verursacht.

Zusammenfassend kann zu diesen Versuchen folgendes besprochen werden: Die Ergebnisse der Flussversuche zeigen signifikante Unterschiede der Proteaseaktivität der ADAMTS1-Varianten zum Wildtyp, teilweise auch der Varianten untereinander.

Die Ergebnisse weichen teilweise deutlich von den in statischen Assays unter denaturierenden Bedingungen observierten Aktivitäten ab, wie in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Vergleich der gemessenen Aktivitäten von ADAMTS13-Varianten mittels Scherfluss-Assay und nach Aktivität im Statischen nach Hassenpflug et al. 2018

Mutante	Aktivität im Scherfluss-Assay	Statische Aktivität nach Hassenpflug et al. 2018
Wildtyp	+++	+++
p.Ile222Thr	+++	-
p.Cys758Arg	+++	-
p.Leu232Gln	+	-
p.Arg349Cys	++	-
p.Pro353Leu	+	Sehr Schwach
p.Pro671Leu	++	+

Die Unterschiede zwischen dem statischen Assay und dem Scherfluss-Assay sind vermutlich darin begründet, dass letztere Methode die Interaktion von ADAMTS13-Varianten mit einzelnen nativen schergestreckten VWF-Fäden misst, während im statischen Assay denaturierte Multimere geschnitten werden. Im Scherfluss-Assay genügt damit ein einzelner Schnitt, damit ein Faden gelöst und damit als abgebaut gilt. In der Auswertung des statischen Assays würde ein einzelner Schnitt in der Multimeranalyse nicht messbar sein. Hier muss ein Abbau aller größerer Multimere zu kleinen Multimeren stattfinden, damit die Aktivität über der Nachweisgrenze liegt. Der

Fluss-Assay ist damit wesentlich sensitiver und näher an den physiologischen Bedingungen und gibt damit ein weitaus genaueres Bild über eventuelle Residualaktivitäten. Die gemessenen Restaktivitäten der ADAMTS13-Varianten lassen den Schluss zu, dass vor allem eine Störung der Sekretion von ADAMTS13 in den von USS betroffenen Patienten ausschlaggebend für geringe ADAMTS13-Aktivität ist.

4.3 Optimierung des Scherfluss-Assays

Die ersten Zeitreihenaufnahmen stellen lediglich den Ausgangszustand dar, wenn ADAMTS13 noch nicht mit VWF interagiert hat. Pro Zeitpunkt werden 12 Bilder aufgenommen, was ca. 32 sec dauert. Die ADAMTS13 wurden so zugegeben, dass nach Beendigung der ersten Bilderfolge das Einlaufen der ADAMTS13 in das System beginnt. Während der Aufnahme der nächsten 12 Bilder werden diese etwas verfälscht, weil durch das Totvolumen im Schlauchsystem und die Mischzeit von ADAMTS13 im System eine Lag-Zeit entsteht. Der daraus resultierende Verlauf der ersten zwei Messwerte suggeriert fälschlicherweise einen sigmoidalen Verlauf der proteolytischen Aktivität von ADAMTS13. Würde das Totvolumen des Systems reduziert, könnte dieser Einfluss minimiert werden.

Die Methode der Längenmessung von 100 VWF-Fäden in Zeitreihenaufnahmen ist insofern noch optimierbar, als dass eine Auswertung zu einem gewissen Grad subjektiv erfolgt. Eine Software könnte die Messungen genauer vornehmen. Die Versuche variieren allerdings in der Ausprägung der VWF-Fäden in Länge, Anzahl und Bildschärfe. Die Auswertung der Zeitreihenaufnahmen mit Matlab ließ sich nicht erfolgreich einsetzen, obwohl eine Messung der Fäden in den Bildern mithilfe einer Grauwertspreizung und einer anschließenden Hough-Transformation theoretisch möglich ist. Die PC-gestützte Auswertung ist allerdings nicht praktikabel, da der Aufwand durch die begrenzte Zahl an Versuchen nicht gerechtfertigt erscheint.

Die Länge der VWF-Multimere ist nicht in jedem Versuch normalverteilt, das könnte einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, dass ein Multimer geschnitten wird, haben. Es lässt sich vermuten, dass bei längeren VWF-Multimeren auch mehr Fläche für das Wirken von Scherkräften zur Verfügung steht und damit ein Schneiden durch ADAMTS13 wahrscheinlicher wird.

Der Umgang mit primären Zellen gestaltet sich technisch aufwändig und wenig robust, da das Risiko von Kontaminationen hoch ist. Die Verwendbarkeit der Zellen ist

begrenzt, da sie nicht immortalisiert sind. Die Entwicklung eines zellfreien Assays ist aktuell in Entwicklung.

Für den rein qualitativen Nachweis der zu wtADAMTS13 relativen Restaktivität von ADAMTS13-Varianten sind die Versuche jedoch hinreichend genau und ist eine sehr gute Methode um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die USS zugrunde liegen.

Der Aufwand dieser Scherfluss-Assays mit Primärzellen macht die Etablierung im diagnostischen Bereich allerdings unpraktikabel. Die Vorversuche zur ADAMTS13 Aktivität mittels eines Aggregometer-Assays dagegen zeigen interessante Ergebnisse in Hinblick auf eine Etablierung als diagnostisches Tool.

4.4 ADAMTS13 Aktivität im Aggregometrie-Assay

Die Messung der ADAMTS13-Aktivität unter Einfluss von Scherkräften mittels LTA wurde in Vorversuchen als Alternative zum Scherfluss-Assay untersucht. Die Versuche zeigen nach Zugabe von wtADAMTS13 eine Auflösung von VWF-Plättchen-Aggregaten. Bei einer Zugabe von p.Pro353Leu ADAMTS13 ist die Auflösung von Aggregaten nur im geringen Umfang zu beobachten. Die gemessene Aktivität war für die Mutante reproduzierbar, und die Messung von wtADAMTS13 wurde von anderen Mitarbeitern im Arbeitskreis in Replikaten durchgeführt.

Dieses Ergebnis ist als Proof of Principle eine alternative Möglichkeit, die scherabhängige Interaktion von VWF und ADAMTS13 zu untersuchen. Die einfach zu handhabenden Versuche sind nicht zeitintensiv und lassen sich mit Geräten umsetzen, die zur Messung der Thrombozytenaggregation im klinischen Bereich oft vorhanden sind.

5 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse der Scherfluss-Assays zeigen Restaktivitäten bei allen der gemessenen ADAMTS13-Varianten, deren Einschränkung der Aktivität durch die Mutation oft durch eine Nähe zu einer signifikanten Region in ADAMTS13 begründet ist. Einige Varianten sind in ihrer Aktivität nicht signifikant von wtADAMTS13 unterscheidbar gewesen, obwohl im Phänotyp USS auftrat. Diese Ergebnisse sprechen für einen starken Einfluss der reduzierten Sekretion von ADAMTS13 bei USS-Patienten.

Während in HEK293 Zellen für die ADAMTS13 eine beschränkte oder stark beschränkte Sekretion festgestellt wurde, ist die Verteilung und Intensität im ER zwischen den Varianten ähnlich. Der Sekretionsweg von ADAMTS13 ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein intrazellulärer Abbau bestimmter ADAMTS13-Varianten durch das Proteosom ist wahrscheinlich.

Beim so genannten VWF Syndrom, einem Mangel an VWF kann das Hormon Vasopressin (DDAVP) als Medikament für eine vermehrte Sekretion von VWF sorgen. Ein ähnlicher Ansatz, der die intrazelluläre Qualitätskontrolle spezifisch bei restaktiven ADAMTS13-Varianten beeinflusst, wäre auch für USS-Patienten neben Plasmabehandlungen und rekombinanten ADAMTS13 interessant.

Wenn das Aggregometrie-Assay sich in der Praxis als robuste Möglichkeit der ADAMTS13 Aktivität etabliert, kann die Methode für die Forschung und Diagnostik vielfältig eingesetzt werden.

Die Erkenntnisse dieser Masterarbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Mit einem dynamischen Scherfluss-Assay ist eine Messung der Aktivität von ADAMTS13-Varianten unter nahezu physiologischen Bedingungen möglich.
- USS-auslösende ADAMTS13-Varianten zeigen ausgeprägte scherabhängige Restaktivitäten, die mit einem statischen, unphysiologischen Assay nicht nachweisbar sind.
- Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Sekretionsstörungen bei einigen USS-Patienten als Ursache der USS einen größeren Anteil haben als die reduzierte Aktivität der ADAMTS13-Varianten.
- Bei zahlreichen ADAMTS13-Varianten lässt sich eine reduzierte Aktivität durch Struktur-Funktionsbeziehungen erklären.

6 Literaturverzeichnis

Agilent (2005): QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit. Catalog # 200514 2005. Online verfügbar unter <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200514.pdf>., zuletzt geprüft am 13.09.2018.

Crawley, James T. B.; de Groot, Rens; Xiang, Yaozu; Luken, Brenda M.; Lane, David A. (2011): Unraveling the scissile bond. How ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. In: *Blood* 118 (12), S. 3212–3221. DOI: 10.1182/blood-2011-02-306597.

de Groot, Rens; Bardhan, Ajoy; Ramroop, Nalisha; A. Lane, David; Crawley, James T. B. (2009): Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. In: *Blood* 113 (22), S. 5609–5616. DOI: 10.1182/blood-2008-11-187914.

Di Cera, Enrico (2011): Proteases in Health and Disease. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks (Progress in molecular biology and translational science, v. 99). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10444570>.

Feys, H. B.; Anderson, P. J.; Vanhoorelbeke, K.; Majerus, E. M.; Sadler, J. E. (2009): Multi-step binding of ADAMTS13 to VWF. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (12). DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03620.x.

Furlan, M.; Robles, R.; Lammle, B. (1996): Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. In: *Blood* 87 (10), S. 4223–4234.

Hassenpflug, Wolf Achim; Obser, Tobias; Bode, Julia; Oyen, Florian; Budde, Ulrich; Schneppenheim, Sonja et al. (2018): Genetic and Functional Characterization of ADAMTS13 Variants in a Patient Cohort with Upshaw-Schulman Syndrome Investigated in Germany. In: *Thrombosis and haemostasis*. DOI: 10.1055/s-0038-1637749.

Hvas, Anne-Mette; Favalaro, Emmanuel J. (2017): Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. In: Emmanuel J. Favalaro und Giuseppe Lippi (Hg.): Hemostasis and thrombosis. Methods and protocols. New York, NY: Humana Press (Springer protocols, 1646), S. 321–331.

IBIDI (2018): Instruction Manual ibidi Pump System. Version 2.1 2018.

Jiménez, Nuria; Krouwer, Vincent J. D.; Post, Jan A. (2013): A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. In: *Cytotechnology* 65 (1), S. 1–14. DOI: 10.1007/s10616-012-9459-9.

Kneser, Ulrich; Horch, Raymund E.; Lehnhardt, Marcus (2016): Grundkurs Mikrochirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Kraus, Emma; Kraus, Kristina; Obser, Tobias; Oyen, Florian; Klemm, Ulrike; Schneppenheim, Reinhard; Brehm, Maria A. (2014): Platelet-free shear flow assay facilitates analysis of shear-dependent functions of VWF and ADAMTS13. In: *Thrombosis research* 134 (6), S. 1285–1291. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.08.013.

Lämmle, Bernhard; Kremer Hovinga, J. A.; Alberio, L. (2005): Thrombotic thrombocytopenic purpura. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3 (8), S. 1663–1675. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01425.x.

Ling, Jing; Ma, Zhenni; Liu, Ling; Yin, Jie; Su, Jian; Shen, Fei et al.: Identification of a crucial tryptophan residue in ADAMTS13 required for its secretion and enzymatic activity. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. DOI: 10.1111/1440-1681.12996.

Lippok, Svenja; Kolšek, Katra; Löf, Achim; Eggert, Dennis; Vanderlinden, Willem; Müller, Jochen P. et al. (2016): von Willebrand factor is dimerized by protein disulfide isomerase. In: *Blood* 127 (9), S. 1183–1191. DOI: 10.1182/blood-2015-04-641902.

Lotta, Luca A.; Garagiola, Isabella; Palla, Roberta; Cairo, Andrea; Peyvandi, Flora (2010): ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. In: *Human Mutation* 31 (1), S. 11–19. DOI: 10.1002/humu.21143.

Osowski, Christine M.; Urano, Fumihiko (2011): Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. In: *Methods in enzymology* 490, S. 71–92. DOI: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0.

PD Dr. rer. nat. Maria A. Brehm (2018): Phänotyp der ADAMTS13-Variante p.Ile222Thr, 27.06.2018. mündlich.

Rieger, Manfred; Ferrari, Silvia; Hovinga, Johanna A. Kremer; Konetschny, Christian; Herzog, Andrea; Koller, Letizia et al. (2006): Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic

microangiopathies (TMA). In: *Thromb Haemost* 95 (02), S. 212–220. DOI: 10.1160/TH05-08-0550.

Rodgers, George M. (Hg.) (2015): ADAMTS13. Biology and disease. Cham: Springer. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1052232>.

Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Thews, Gerhard (Hg.) (2005): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 78 Tabellen ; [neue Approbationsordnung]. 29., vollst. neu bearb. und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/b137547>.

Schneppenheim, Reinhard; Budde, Ulrich; Oyen, Florian; Angerhaus, Dorothea; Aumann, Volker; Drewke, Elke et al. (2003): von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. In: *Blood* 101 (5), S. 1845–1850. DOI: 10.1182/blood-2002-08-2399.

Scully, Marie; Knöbl, Paul; Kentouche, Karim; Rice, Lawrence; Windyga, Jerzy; Schneppenheim, Reinhard et al. (2017): Recombinant ADAMTS-13. First-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. In: *Blood* 130 (19), S. 2055–2063. DOI: 10.1182/blood-2017-06-788026.

Shelat, Suresh G.; Ai, Jihui; Zheng, X. Long (2005): Molecular Biology of ADAMTS13 and Diagnostic Utility of ADAMTS13 Proteolytic Activity and Inhibitor Assays. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31 (6), S. 659–672. DOI: 10.1055/s-2005-925472.

Springer, Timothy A. (2014): von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. In: *Blood* 124 (9), S. 1412–1425. DOI: 10.1182/blood-2014-05-378638.

Török, Thomas J.; Holman, Robert C.; Chorba, Terence L. (1995): Increasing mortality from thrombotic thrombocytopenic purpura in the United States—analysis of national mortality data, 1968–1991. In: *American Journal of Hematology* 1995 (2), S. 84–90. DOI: 10.1002/ajh.2830500203.

Tsai, H. M. (1996): Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. In: *Blood* 87 (10), S. 4235–4244.

- Uemura, Masahito; Tatsumi, Kouko; Matsumoto, Masanori; Fujimoto, Masao; Matsuyama, Tomomi; Ishikawa, Masatoshi et al. (2005): Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. In: *Blood* 106 (3), S. 922–924. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0152.
- Underwood, Mary; Peyvandi, Flora; Garagiola, Isabella; Machin, Samuel; Mackie, Ian (2016): Degradation of two novel congenital TTP ADAMTS13 mutants by the cell proteasome prevents ADAMTS13 secretion. In: *Thrombosis research* 147, S. 16–23. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.09.014.
- Veyradier, A.; Lavergne, J-M.; Ribba, A-S.; Obert, B.; Loirat, C.; Meyer, D.; Girma, J-P. (2004): Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw–Schulman syndrome). In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (3), S. 424–429. DOI: 10.1111/j.1538-7933.2004.00623.x.
- Wagner, D. D. (1990): Cell biology of von Willebrand factor. In: *Annual review of cell biology* 6, S. 217–246. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.001245.
- Will, Horst (2014): Molekularbiologie kurz und bündig. Berlin Germany: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=821950>.
- Willebrand, E. A. Von (1999): Hereditary pseudohaemophilia. In: *Haemophilia* 5 (3), S. 223–231. DOI: 10.1046/j.1365-2516.1999.00302.x.
- Zheng, X. Long (2015): ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. In: *Annual review of medicine* 66, S. 211–225. DOI: 10.1146/annurev-med-061813-013241.
- Zheng, Xinglong; Nishio, Kenji; Majerus, Elaine M.; Sadler, J. Evan (2003): Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (32), S. 30136–30141. DOI: 10.1074/jbc.M305331200.
- Zhou, Yan-Feng; Eng, Edward T.; Nishida, Noritaka; Lu, Chafen; Walz, Thomas; Springer, Timothy A. (2011): A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. In: *The EMBO Journal* 30 (19), S. 4098–4111. DOI: 10.1038/emboj.2011.297.

Zhou, Yan-Feng; Eng, Edward T.; Zhu, Jieqing; Lu, Chafen; Walz, Thomas; Springer, Timothy A. (2012): Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. In: *Blood* 120 (2), S. 449–458. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405134.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansatz des QuikChange Kit (Agilent)	12
Tabelle 2: Primer zu p.Ile222Thr und p.Cys758Arg von ADAMTS13 (MetaBion), je 0,04 μ M. Das zur Punktmutation genutzte Codon ist rot markiert.	12
Tabelle 3: Parameter des Thermocyclers für die Mutagenese	13
Tabelle 4: Für Transformation genutzte Plasmide	14
Tabelle 5: One Shot® Mach1™-T1R Chemically Competent <i>E. coli</i> (Invitrogen)	14
Tabelle 6: PureLink® Quick Plasmid DNS Miniprep Kit (Invitrogen)	14
Tabelle 7: PCR Master-Mix	16
Tabelle 8: Konfiguration des Thermocyclers für die PCR	16
Tabelle 9: PCR Master-Mix	16
Tabelle 10: ADAMTS13 Sequenzvergleich nach Sequenzierung	17
Tabelle 11: HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen)	17
Tabelle 12: Materialien zur Transfektion von HEK293 Zellen	18
Tabelle 13: Eingesetzte Plasmide für die Transfektionen	18
Tabelle 14: Zusammensetzung Selektionsmedium DMEM (1x) + GlutaMax-1 500 μ g ml ⁻¹ G418	18
Tabelle 15: Material zur Kultivierung von HEK Zellen	19
Tabelle 16: Zusammensetzung DMEM HEK293 Medium	19
Tabelle 17: Material zur Kultivierung von HUVEC Zellen	20
Tabelle 18: Material zur Expression von Proteinen mit HEK293 Zellen	21
Tabelle 19: Materialien zur quantitativen Bestimmung von ADAMTS13 (IMUBIND®)	22
Tabelle 20: Material zur transienten Transfektion von HEK293 Zellen	23
Tabelle 21: Transfektionsansatz für ein Well	24
Tabelle 22: Antikörper für Immunfluoreszenz	25
Tabelle 23: Materialien für Scherfluss- Assays mit Primärzellen	26
Tabelle 24: Zusammensetzung des Ca-freien Tyrode's Puffers pH = 6,5	29
Tabelle 25: Zusammensetzung des Plättchenresuspensionspuffers pH = 7,4	29
Tabelle 26: Versuchsansätze Aggregometrie	30
Tabelle 27: Signifikanzen der proteolytischen Aktivität von wtADAMTS13 gegen Varianten von ADAMTS13, die mittels Zweistichproben-t-Test berechnet wurden	39
Tabelle 28: Initiale Aktivitäten der ADAMTS13-Varianten in % Cleavage per min und ng ml ⁻¹ .	39

Tabelle 29: Stärke der Sekretion der verschiedenen ADAMTS13 Varianten in HEK293 Zellen. * Daten zur Sekretion nach Hassenpflug et al. 2018 43

Tabelle 30: Vergleich der gemessenen Aktivitäten von ADAMTS13-Varianten mittels Scherfluss-Assay und nach Aktivität im Statischen nach Hassenpflug et al. 2018 48

8 Abbildungsverzeichnis

Thrombozytenadhäsion und -aggregation als Teil der primären Hämostase	3
Schema der Blutgerinnung.....	4
Schematische Darstellung der Domänen des VWF	5
Exposition von funktionellen Domänen von VWF, ausgelöst durch Scherkräfte	6
Darstellung der Domänen von ADAMTS13.....	7
Interaktion von ADAMTS13 mit VWF	8
Darstellung eines durch ADAMTS13-Defizienz entstehenden Thrombus	10
Vektorkarte des pIRES neo 2 Vektors.....	13
Darstellung eines indirekten Sandwich-Elisa.....	23
Aufbau des Perfusion Sets der Firma IBIDI für Scherfluss-Assays	27
Intrazelluläre Lokalisation von ADAMTS13 und PDI.	33
2D Histogramm der Intensität von Pixeln aus dem roten und grünen Kanal eines Immunfluoreszenz-Scans.....	34
Proteolytischer Abbau von VWF-Fäden durch wtADAMTS13 in einem Scherfluss-Assay	36
Darstellung der relativen Abnahme der VWF-Länge (Cleavage) -1	37
Darstellung der relativen Abnahme der VWF-Länge (Cleavage) - 2	38
Darstellung der relativen Abnahme der VWF-Länge	38
Mittelwert der VWF-Cleavage durch ADAMTS13 Varianten nach 2,4 min	39
Verlauf der Aggregation von VWF und Thrombozyten	41
Die Mittelwerte der normalisierten Turbidität vom wtADAMTS13 und p.Pro353Leu..	41
Position der Punktmutationen der in dieser Arbeit untersuchten ADAMTS13-Varianten	44

MP und Dis Domäne von ADAMTS13 in der Interaktion mit VWF. Arg ³⁴⁹	46
Proteolytischer Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13 p.Arg349Cys in einem Scherfluss-Assay.....	A

9 Anhang

Anhang 1: Scherfluss-Assay ADAMTS13 p.Arg349Cys

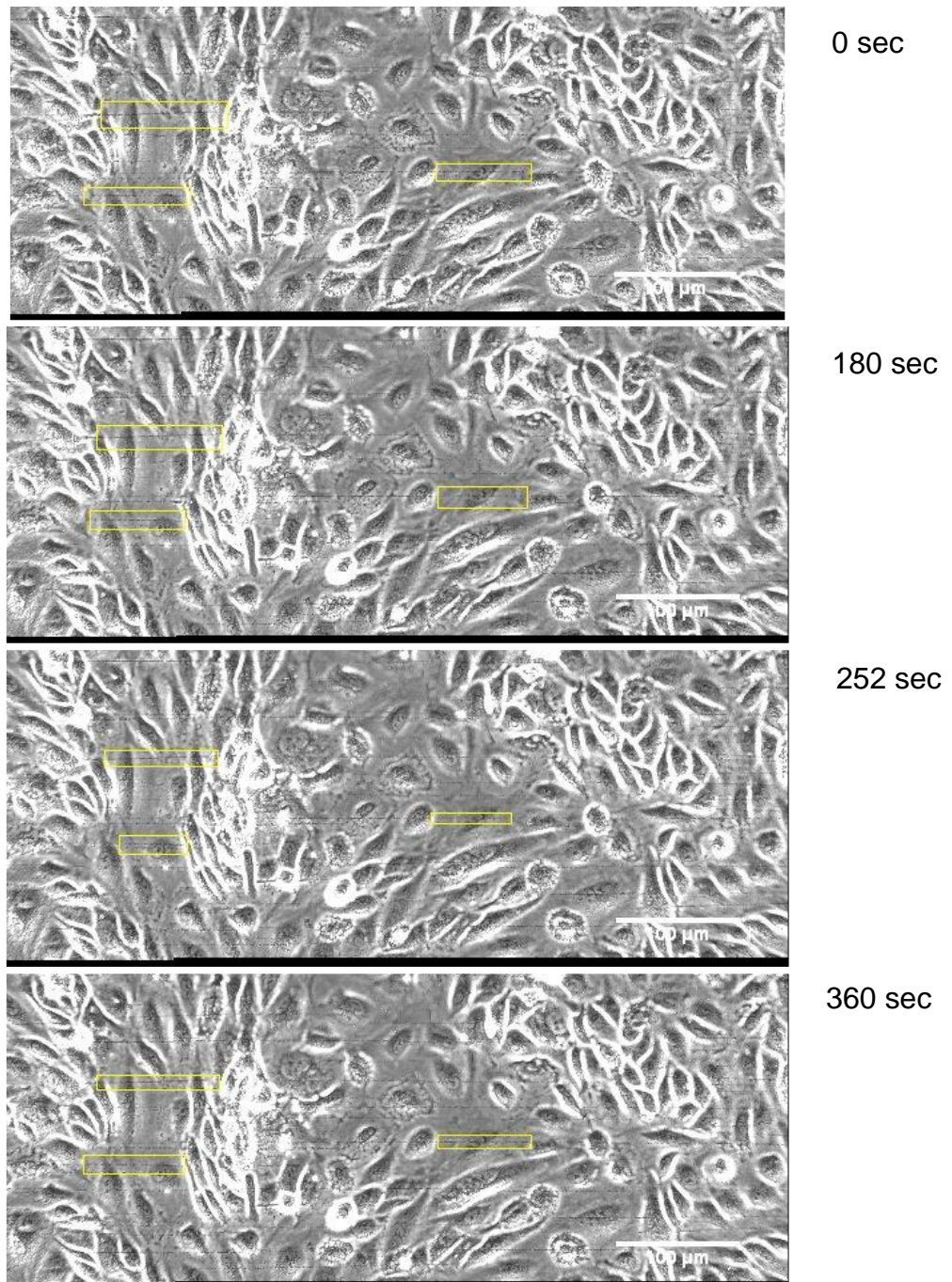


Abbildung 21: Proteolytischer Abbau von VWF-Fäden durch ADAMTS13 p.Arg349Cys in einem Scherfluss-Assay. Dargestellt sind HUVEC-Zellen, die über Nacht in einem 0,4μ-Slide (Ibidi) kultiviert wurden. Die wurden mit Histamin unter Scherfluss zur Sekretion von VWF angeregt. Im Durchlichtkanal des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 bei 20x Vergrößerung. Es sind verschiedene VWF-Fäden durch den GPIIb-Latexkügelchen-Komplex sichtbar, die nach der Zugabe von 100 ng ml^{-1} p.Arg349Cys ADAMTS13 in Anzahl und Länge kaum abnehmen. Ein Bereich mit VWF-Fäden, der innerhalb von 360 sec abgebaut wird, ist gelb markiert.

Anhang 2: Mittelwerte der Turbidität in % zu verschiedenen Zeiten des Aggregometrie-Versuchs

Die Mittelwerte der Turbidität zwischen 3-12 min:

	wtADAMTS13	p. Pro353Leu V1	p. Pro353Leu V2	p. Pro353Leu V3	Mittelwert Pro353Leu
Nicht normalisiert	35,56	34,39	39,28	29,18	34,28
Normalisiert	0	0	0	0	0

Die Mittelwerte der Turbidität zwischen 31-32 min:

	wtADAMTS13	p. Pro353LeuV1	p. Pro353Leu V2	p. Pro353Leu V3	Mittelwert Pro353Leu
Nicht normalisiert	66,86	41,16	44,29	43,25	42,90
Normalisiert	47,84	10,17	8,25	19,87	12,76

Anhang 3:Drei-Buchstaben-Code

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code
alanine	ala
arginine	arg
asparagine	asn
aspartic acid asp	
asparagine or aspartic acid	asx
cysteine	cys
glutamic acid	glu
glutamine	gln
glutamine or glutamic acid	glx
glycine	gly
histidine	his
isoleucine	ile
leucine	leu
lysine	lys
methionine	met
phenylalanine	phe
proline	pro
serine	ser
threonine	thr
tryptophan	trp
tyrosine	tyr
valine	val