

Hochschule für Angewandte Wissenschaften  
Fakultät Life Sciences

**Entwicklung diagnostiktauglicher Assays zur Messung der Proteolyse von Aggregaten aus Thrombozyten und von-Willebrand-Faktor-Varianten unter Flussbedingungen**

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Katja Lehmann



7. April 2019

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 1. Gutachter/in | Prof. Dr. Gesine Cornelissen<br>(HAW Hamburg)   |
| 2. Gutachter/in | PD Dr. Maria A. Brehm<br>(Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) |

Die Bachelorarbeit wurde erstellt und betreut im Labor der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

## I. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Maria A. Brehm für die Möglichkeit der Absolvierung meiner Bachelorarbeit im Labor der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bedanken. Mein herzliches Dankeschön gilt ihr vor allem für die gute Betreuung, die hilfreichen Ratschläge und die anregenden Diskussionen im Rahmen des Praxissemesters und der Bachelorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich recht herzlich bei Gesa König und Tobias Obser für die vielen Anregungen, Hilfestellungen und die großartige Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Herrn Dr. med. Sven Peine (Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung der Buffy Coats für die Isolierung von Thrombozyten.

Bei Frau Prof. Dr. Cornelissen bedanke ich mich für die Bereitschaft der Betreuung meiner Bachelorarbeit und Ihren Besuch während meines Praxissemesters.

Ferner bedanke ich mich bei meiner Schwester Alena Lehmann, meiner Mutter und Timo Reimer, die immer für mich da sind, für Ihre großartige Unterstützung und die Ermutigungen während des gesamten Studiums.

**II. Inhaltsverzeichnis**

<b>I. Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>II. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Der von-Willebrand-Faktor .....	1
1.2. Aufbau des Gefäßsystems und dessen Bestandteile .....	3
1.3. Primäre und sekundäre Hämostase .....	4
1.4. ADAMTS13 .....	6
1.5. Das von-Willebrand-Syndrom.....	8
1.5.1. Klassifizierung .....	8
1.5.2. Symptome .....	8
1.6. Funktionelle Parameter der untersuchten VWF-Varianten .....	9
1.7. Zielsetzung der Bachelorarbeit .....	11
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1. Materialien .....	12
2.1.1. HEK293 Zelllinie.....	12
2.2. Methoden .....	12
2.2.1. Zellbiologische Methoden.....	12
2.2.1.1. Auftauen von HEK293 Zellen .....	12
2.2.1.2. Zellkultur und Zellpassagieren .....	13
2.2.1.3. Herstellung von rekombinanten Proteinen in HEK293 Zellen .....	13
2.2.1.4. Einfrieren von HEK293 Zellen .....	14
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden .....	15
2.2.2.1. Konzentrierung von rekombinanten Proteinen.....	15
2.2.2.2. ADAMTS13-ELISA .....	15
2.2.2.3. VWF-ELISA .....	16

---

2.2.2.4. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen.....	17
2.2.2.4.1. Protein-Kopplung an carboxylierte Polybeads.....	17
2.2.2.4.2. Verschiedene Beschichtungen eines Kanal-Slides .....	18
2.2.2.4.3. Herstellung von GPIIb $\alpha$ -Latexbeads.....	21
2.2.2.4.4. Nachweisreaktionen .....	21
2.2.2.4.5. Beschreibung des Flusssystems und dessen Anwendung.....	21
2.2.2.4.6. Immunfluoreszenz .....	23
2.2.2.5. Light Transmission Aggregometry (Lichttransmissionsaggregometrie) . .....	23
2.2.2.5.1. Tests mit GPIIb $\alpha$ -Latexbeads und wtVWF .....	23
2.2.2.5.2. Isolierung von Plättchen aus einem Buffy-Coat.....	24
2.2.2.5.3. Messung der Plättchenaktivität.....	25
2.2.2.5.4. Messung der Bildung und des Abbaus von Plättchen-VWF-Komplexen mittels LTA.....	25
2.2.2.5.5. Datenauswertung .....	26
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
3.1. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen.....	27
3.2. Proteolyse von VWF-Varianten im LTA.....	39
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen.....	49
4.2. Proteolyse von VWF-Varianten im LTA.....	53
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>IX. Anhang .....</b>	<b>I</b>
a. Eingestellte Flusseinstellungen am Ibidi Flusssystem .....	I
b. Verwendete Geräte .....	IV
c. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	V

---

d.	Verwendete Chemikalien.....	V
e.	Verwendete Lösungen und Medien .....	VI
f.	Verwendete Antikörper .....	VIII
<b>X.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>XI.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>XII.</b>	<b>Drei-Buchstabencode .....</b>	<b>XI</b>
<b>XIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>XIV.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XVI</b>

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>ADAMTS13</b>	a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13
<b>AG</b>	Arbeitsgruppe
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
<b>DDAVP</b>	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin (Desmopressin)
<b>DMEM</b>	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
<b>EDAC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FVIII</b>	Blutgerinnungsfaktor VIII
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>HEK</b>	Human Embryonic Kidney Cells
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>LTA</b>	Light Transmission Aggregometer
<b>NEAA</b>	non-essential amino acid
<b>RIPA</b>	Ristocetin-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SFM</b>	Serumfreies Medium
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidine
<b>VWS</b>	von-Willebrand-Syndrom
<b>VWF</b>	von-Willebrand-Faktor
<b>WPK</b>	Weibel-Palade-Körperchen
<b>wt</b>	Wildtyp

## 1. Einleitung

Der von-Willebrand-Faktor (VWF) ist ein großes, multimeres Glykoprotein (GP), welches vorrangig an der Plättchenadhäsion während der primären Hämostase und der Stabilisierung des Blutgerinnungsfaktors VIII (FVIII) in der Zirkulation beteiligt ist (Schmidt et al. 2011). Unter erhöhtem Scherfluss des Blutes, wie er bei einer Wunde auftritt, wird der VWF aktiviert und kann damit Blutplättchen (Thrombozyten) rekrutieren, wodurch die Wunde geschlossen wird. Der Abbau und die Regulation des VWF erfolgen nur wenn, durch die Bindung der Blutplättchen, die Scherkräfte noch weiter erhöht werden, und zwar durch die Protease, die als a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13 (ADAMTS13) bezeichnet wird (Crawley et al. 2011).

Mutationen innerhalb des *VWF*-Gens können den enzymatischen Abbau des VWF durch ADAMTS13 beeinträchtigen. Aktuelle diagnostische Assays zur Messung der Proteolyse von VWF-Multimeren durch ADAMTS13 werden ausschließlich unter statischen Bedingungen durchgeführt. Dabei werden die physiologischen Bedingungen in der Blutzirkulation nicht treffend simuliert, weshalb es vorteilhaft wäre diagnostische Assays zur Verfügung zu haben, die unter Flussbedingungen durchgeführt werden können.

### 1.1. Der von-Willebrand-Faktor

Der VWF wurde nach dem finnischen Arzt Erik Adolf von Willebrand (1870-1949) benannt und ist primär an der Plättchenadhäsion während der primären Hämostase beteiligt (Schmidt et al. 2011). Außerdem wird der Blutgerinnungsfaktor VIII vor dem vorzeitigen Entfernen aus der Zirkulation geschützt (Clearance) (Schneppenheim und Budde 2008). Hierbei bindet zirkulierender FVIII an die D'-Domäne des VWF, womit sich die FVIII-Halbwertszeit von 3 Stunden auf 12-14 Stunden verlängert (Schneppenheim und Budde 2008).

Die Synthese des VWF erfolgt in Endothelzellen sowie in Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Blutplättchen (Thrombozyten). Dabei besteht das primäre Produkt, ein prä-pro-VWF Monomer, aus 2.813 Aminosäuren (Titani et al. 1986). Nach einer Reihe komplexer posttranslationaler Modifikationen im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat entstehen VWF-Multimere, die aus Dimeren zusam-

mengesetzt sind (Wagner 1990). Abhängig von der VWF-Dimeranzahl weisen die VWF-Multimere eine Größe zwischen 500 und 20.000 kDa auf.

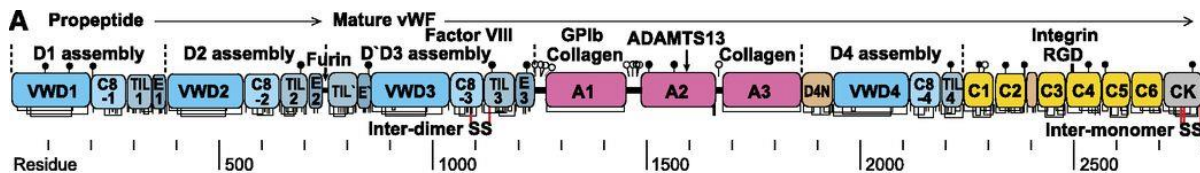
Die Endothelzellen sekretieren die VWF-Multimere entweder ins Plasma oder speichern sie in endothel-spezifischen Zellorganellen, den Weibel-Palade-Körperchen (WPK), bis die Zellen zur Sekretion des VWF stimuliert werden (Weibel 1964). Die Ausschüttung des VWF aus den WPK kann durch unterschiedliche Signale, z.B. Histamin (Hamilton und Sims 1987) oder Adrenalin (Vischer und Wollheim 1997) ausgelöst werden. Ein Teil des VWF wird außerdem konstitutiv ausgeschüttet (Nightingale und Cutler 2013).

Ebenfalls wird VWF in Thrombozyten, in den sogenannten  $\alpha$ -Granula, gespeichert. Bei Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Ausschüttung des VWF. Damit liegt die VWF-Konzentration im Blutkreislauf bei 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , wobei 80% der Konzentration aus dem Endothel und 20% aus den Thrombozyten stammen (Bowie et al. 1986).

Der Abbau und die Regulation des VWF erfolgt nur unter Scherfluss durch die Protease ADAMTS13 (Crawley et al. 2011). Dabei liegt die Schnittstelle innerhalb des VWF für ADAMTS13 in der A2-Domäne (**Abbildung 1**).

Wegen seiner Multidomänen-Struktur besitzt der VWF verschiedene Funktionen während der primären und sekundären Hämostase und kann unterschiedliche Moleküle binden. VWF besteht aus drei sich wiederholenden Domänen (A, C, D) (**Abbildung 1**). Am N-terminalen Ende befindet sich ein Propeptid, welches 741 Aminosäuren lang ist und aus einer D1- und D2-Domäne besteht. Dieses Propeptid ermöglicht die Multimerisierung des VWF und wird dabei zwischen der D2- und D`D3-Domäne von der Protease Furin abgespalten (Zhou et al. 2012).





**Abbildung 1: Schematische Darstellung der molekularen Struktur des VWF-Monomers mit den verschiedenen Domänen sowie deren funktionellen Regionen mit Bindungspartnern.** Am N-terminalen Ende befindet sich ein Propeptid, welches 741 Aminosäuren lang ist und aus einem D1- und D2-Assembly besteht. Dieses Propeptid ermöglicht die Multimerisierung des VWF und wird im Golgi-Apparat zwischen der D2- und D'D3-Domäne von der Protease Furin abgespalten. Der dabei entstehende mature VWF besteht aus 2.050 Aminosäuren und besitzt in seinen Domänen verschiedene Protein-Bindungsstellen, die eine wichtige Rolle bei der Hämostase spielen. (Springer 2014).

## 1.2. Aufbau des Gefäßsystems und dessen Bestandteile

Die einzelnen Gefäße des menschlichen Körpers bilden zusammen das Gefäßsystem. Dies sorgt für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und gewährleistet den Abtransport von Abfallprodukten. An der Innenwand der Gefäße sind Endothelzellen angelagert, welche das Blut vom Gewebe trennen (Schneider, M. F., Schneider, S. W. 2008). In den Gefäßen herrscht eine überwiegend laminare Strömung, bei der die Scherrate in Kapillaren bei ca. 1.000 1/s und in Arteriolen bei 8.000 1/s liegt (Schneider, M. F., Schneider, S. W. 2008).

Die Viskosität des Blutes ist stark von dessen Lokalisation in der Blutbahn sowie von der gesundheitlichen Verfassung des Menschen abhängig. Sie liegt bei Frauen durchschnittlich bei  $4,50 \pm 0,65$  mPa·s und bei Männern bei  $6,11 \pm 0,95$  mPa·s (Vázquez 2012).

Die zellulären Bestandteile des Blutes sowie dessen Eigenschaften spielen während der primären und sekundären Hämostase eine wichtige Rolle.

Rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sind mit einer Konzentration von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ $\mu$ L und einer Größe von etwa 7,5  $\mu$ m die größten Zellen im menschlichen Blut. Diese enthalten Hämoglobin (roter Blutfarbstoff) und sind für den Sauerstofftransport und den Kohlenstoffdioxidabtransport verantwortlich (Schmidt et al. 2011).

Weißer Blutkörperchen (Leukozyten) sind etwa 7  $\mu$ m groß und sind in einer geringeren Konzentration (ca.  $4-11 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu$ L) als Erythrozyten im Blut enthalten. Leukozyten gehören zum Immunsystem des Menschen und dienen der Abwehr von Krankheitserregern (Schmidt et al. 2011).

Die Blutplättchen (Thrombozyten) stellen mit einer Konzentration von  $150\text{--}380 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$ , mit einer Größe von ca.  $2\text{--}3 \mu\text{m}$ , die kleinsten Zellen im Blut dar. Bei der Blutgerinnung übernehmen die Thrombozyten wichtige Aufgaben. Einer der ersten Prozesse nach einer Verletzung ist die Bindung an VWF, woraufhin die Plättchen aktiviert werden und schlussendlich den Wundverschluss vermitteln (Schmidt et al. 2011).

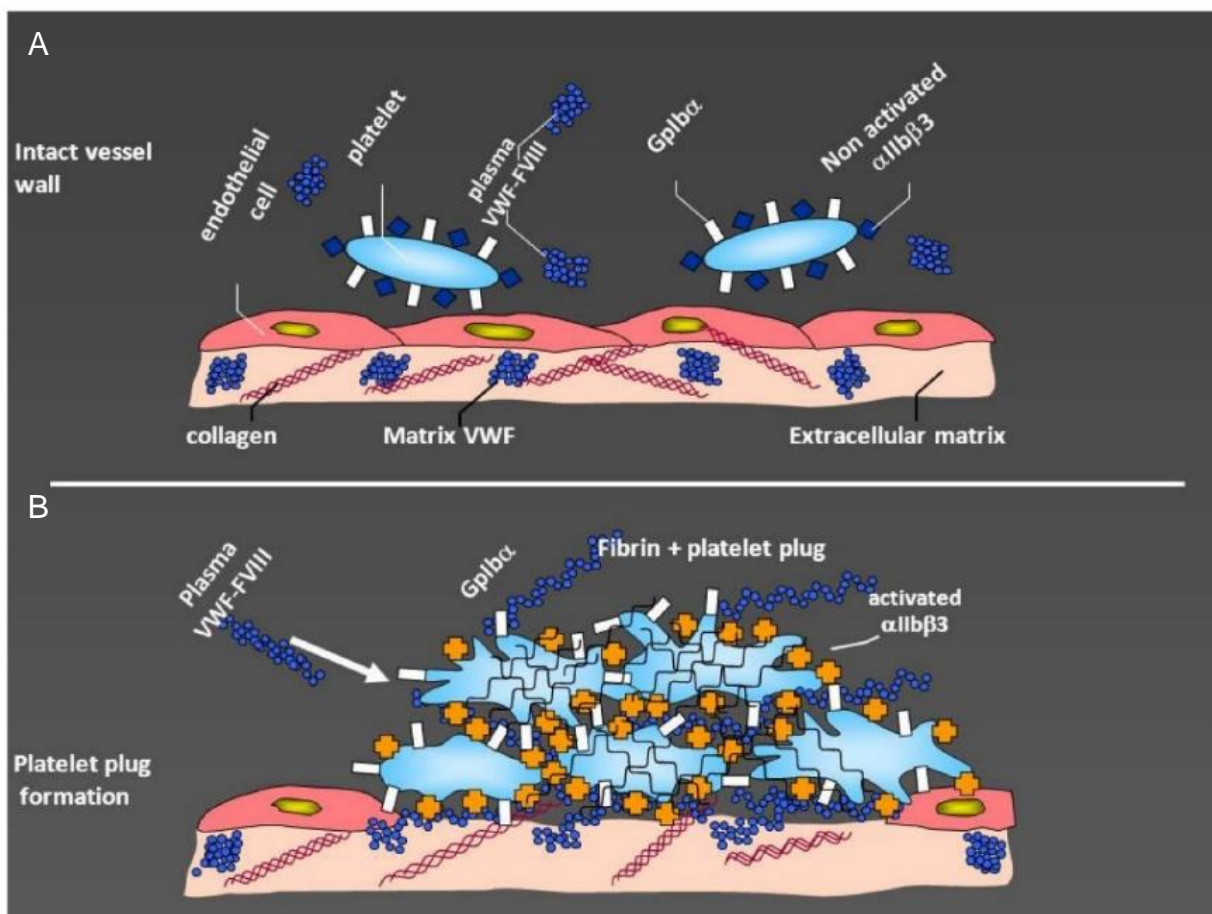
Die Blutflüssigkeit (Blutplasma), die ca. 55% des Blutvolumens ausmacht, besteht zu über 90% aus Wasser. Neben den bereits aufgezählten, zellulären Bestandteilen sind im Blutplasma weitere Substanzen wie Salze, Fette, Hormone, Vitamine etc. gelöst (Schmidt et al. 2011).

### 1.3. Primäre und sekundäre Hämostase

Allgemein wird unter Hämostase der physiologische Vorgang während des Stillens einer Blutung nach einer Gefäßverletzung verstanden. Dieser Prozess wird in primäre und sekundäre Hämostase gegliedert und geht fließend ineinander über.

Die primäre Hämostase (**Abbildung 2**) verläuft in drei Schritten: Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation. Nach einer Verletzung der Gefäße kommt es während der Vasokonstriktion zur Verengung des verletzten Gefäßabschnittes, wodurch der Blutstrom verlangsamt wird und weniger Blut herausströmt. Vor der Thrombozytenadhäsion bindet VWF über seine A1- und A3-Domäne an das freiliegende, subendotheliale Kollagen. Durch die Vasokonstriktion wird die Scherkraft erhöht und der VWF gestreckt und die GPIIb $\alpha$ -Bindungsstelle freigelegt (Behrends J.C. et al. 2010). Über diesen Adhäsionsrezeptor binden Thrombozyten, die dadurch aktiviert werden. Im Anschluss folgt die Thrombozytenaggregation, indem es zur Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche kommt. GPIIb/IIIa vernetzt die Thrombozyten durch die Bindung von Fibrinogen. Weiterhin wird VWF über die RGD-Sequenz in seiner C4-Domäne gebunden. Aufgrund des entstehenden Thrombozytenpfropfens wird die Blutung gestoppt (Behrends J.C. et al. 2010). Das Öffnen der A1-Domäne des VWF kann zusätzlich von Ristocetin, einem Antibiotikum, hervorgerufen werden, sodass die GPIIb $\alpha$ -Bindungsstelle freigelegt wird und die Bindung an die Thrombozyten stattfinden kann (Boender et al. 2018). Aufgrund dieser Nebenwirkung wird das Antibiotikum nur noch in der Diagnostik bei der sogenannten RIPA (Ristocetin-induzierte Aggregation im plättchenreichen Plasma) oder VWF:RCo (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität) eingesetzt.

Bei der sekundären Hämostase wird ein festes Fasernetz aus Fibrin gebildet, in dem Thrombozyten und Erythrozyten eingelagert sind. Die sekundäre Hämostase wird in drei Phasen unterteilt: die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase (Behrends J.C. et al. 2010). In der Aktivierungsphase wird Prothrombin mit Hilfe von Prothrombinaktivator in Thrombin umgewandelt. Während der Koagulationsphase entsteht ein Fibrinnetz, indem Thrombin Fibrin von Fibrinogen abspaltet. Bei der Retraktionsphase handelt es sich um den endgültigen Verschluss der Wunde, indem die Wundränder zusammengezogen werden (Schmidt et al. 2011).



**Abbildung 2: VWF bei der Bildung eines weißen, plättchenreichen Thrombus.** In (A) ist das intakte Endothel mit den darüber strömenden Blutplättchen sowie VWF zu erkennen. Sobald durch eine Verletzung das Endothel beschädigt wird (B), lagert sich der VWF an das Kollagen an. Dadurch wird die Scherkraft erhöht und der VWF gestreckt, wodurch die GPIIb/IIIa-Bindungsstelle freigelegt wird. Daraufhin binden Thrombozyten, wodurch es zur Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche kommt. GPIIb/IIIa vernetzt die Thrombozyten durch die Bindung von Fibrinogen. Aufgrund der gebundenen Blutplättchen am VWF kann sich anschließend ein Thrombus bilden. Dadurch wird die Wunde geschlossen und die Blutung gestillt. (Castaman und Linari 2017)

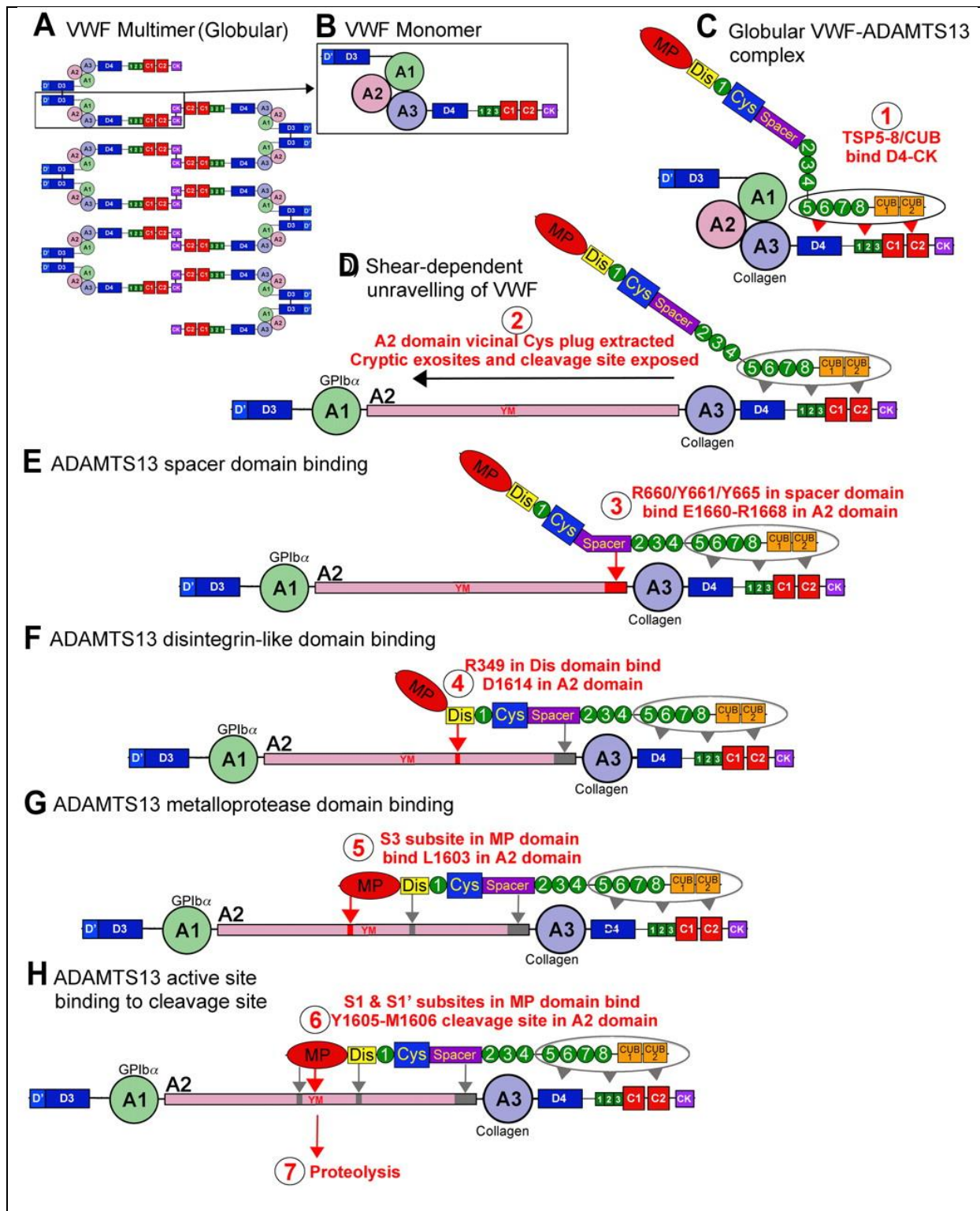
#### 1.4. ADAMTS13

ADAMTS13 ist ein spezifisches VWF-spaltendes Enzym, welches zur Familie der Zink-abhängigen Metalloproteasen gehört (Crawley et al. 2011). Die ADAMTS13-Konzentration im menschlichen Plasma liegt bei 0,7–1,4 µg/ml (Rieger et al. 2006).

Es finden scherabhängige und -unabhängige Bindungsvorgänge zwischen VWF und ADAMTS13 statt. Die Proteolyse des VWF durch ADAMTS13 erfolgt entweder auf der Oberfläche des Endothels oder auch bei freizirkulierendem VWF im Blut (**Abbildung 3**).

VWF-Multimere sind aus VWF-Dimeren zusammengesetzt und durch N-terminale Disulfidbrücken verbunden. Dimere bestehen wiederum aus Monomeren, die über C-terminale Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Proteaseschnittstelle für ADAMTS13 liegt in der A2-Domäne, die in der globulären VWF-Konformation normalerweise geschlossen ist. Die Kollagenbindungsstelle in der A3-Domäne ist dagegen geöffnet (**Abbildung 3, A-B**). ADAMTS13 tritt mit den thrombospondin type 1(TSP)-Repeats (5-8) und CUB-Domänen in Wechselwirkung mit dem VWF, wodurch sich ein globulärer VWF-ADAMTS13 Komplex ausbildet (**Abbildung 3, C**). Unter erhöhtem Scherfluss wird der VWF gestreckt, wodurch die VWF A2-Domäne geöffnet wird (**Abbildung 3, D**). Die Spacer-Domäne der ADAMTS13 erkennt die geöffnete Bindungsregion der VWF A2-Domäne und bindet an diese (**Abbildung 3, E**). Nach weiteren Bindungsvorgängen des aktiven Zentrums der ADAMTS13 an die VWF A2-Domäne kommt es zur Proteolyse des VWF durch Spaltung der Bindung zwischen den beiden Aminosäuren Tyr1605 und Met1606 (YM) (**Abbildung 3, F-H**) (Crawley et al. 2011). Durch diesen Vorgang wird die Regulierung der Größe des VWF sichergestellt.

Ohne diesen Regulationsmechanismus könnte der VWF nicht abgebaut werden, was wiederum zu Thrombosen führen kann. Dies geschieht z.B. beim Upshaw-Schulman Syndrom, bei dem Mutationen zu einer Inaktivierung von ADAMTS13 führen.



**Abbildung 3: Proteolyse von VWF mittels ADAMTS13.** Zirkulierende VWF-Multimere im Plasma (A) sind aus VWF-Monomeren (B) zusammengesetzt und durch Disulfidbrücken verbunden. Die Proteaseschnittstelle für ADAMTS13 liegt in der A2-Domäne und ist in der globulären VWF-Konformation normalerweise geschlossen. Die Kollagenbindungsstelle in der A3-Domäne ist dagegen geöffnet. ADAMTS13 und VWF treten in Wechselwirkung, wodurch sich ein globulärer VWF-ADAMTS13 Komplex ausbildet (C). Unter erhöhtem Scherfluss wird die VWF A2-Domäne geöffnet (D), an die ADAMTS13 mit dem aktiven Zentrum bindet (E-G) und der VWF proteolysiert wird. (Crawley et al. 2011)

## **1.5. Das von-Willebrand-Syndrom**

Strukturelle sowie quantitative Veränderungen des VWF, welche durch Mutationen im *VWF*-Gen hervorgerufen werden, führen zur häufigsten vererbten Gerinnungsstörung, dem von-Willebrand-Syndrom (VWS). Das Syndrom betrifft ca. 1-2% der Weltbevölkerung, wobei nur 1/8.000 Personen klinisch relevante Symptome aufweisen (Schneppenheim und Budde 2008).

### **1.5.1. Klassifizierung**

Aufgrund der Vielseitigkeit des VWF können verschiedene Defekte auftreten. Abhängig von der Störung und Blutungsdauer, lässt sich das VWS in drei Hauptklassen unterteilen (Typ 1, 2 und 3).

Bei Typ 1 besteht ein quantitativer Defekt mit verringerter VWF-Konzentration im Plasma.

Typ 2 weist Störungen in Struktur und Funktion des VWF auf und wird in vier Unterklassen gegliedert (2A, 2B, 2M und 2N). Die Unterklassen haben verschiedene Hauptmerkmale: Bei Typ 2A werden keine oder weniger große Multimere gebildet, wodurch die Thrombozytenbindung verringert ist. Bei Typ 2B besteht eine erhöhte Affinität von VWF zum GPIIb $\alpha$ -Rezeptor, ausgelöst durch Mutationen in der A1-Domäne. Dies hat eine verstärkte Bindung der VWF-Multimere an die Thrombozyten zur Folge, wodurch sie nicht mehr für die Blutgerinnung zur Verfügung stehen. Bei Typ 2M dagegen besteht eine verminderte Affinität der VWF-Multimere zu den Thrombozyten und bei Typ 2N eine verminderte Bindung an FVIII.

Bei Typ 3 ist praktisch kein VWF im Blut nachweisbar, was zu der schwersten Form des VWS führt (Schneppenheim und Budde 2008).

### **1.5.2. Symptome**

Die Symptome des VWS sind von der Schwere der Störung abhängig und können sehr unterschiedlich ausfallen. Unabhängig vom Typ der Störung sind bei allen Klassen Symptome wie verlängerte Schleimhautblutung, wie z.B. Nasen- und Zahnfleischblutungen, zu beobachten. Frauen leiden zudem an verstärkter und längerer Menstruationsblutung sowie Blutungen nach der Geburt. Zu den weiteren Symptomen zählen Blutungen des Magen-Darmtraktes, des Urogenitalsystems und oberflächliche Hämatome.

Die Blutungsdauer ist abhängig vom VWS-Typ. So haben Patienten mit VWS Typ 1 im Gegensatz zu Patienten mit VWS Typ 3 eine weniger ausgeprägte Blutungsneigung. Bei VWS Typ 2-Patienten hingegen variieren die Symptome sowie die Blutungsdauer in Abhängigkeit der Subtypen (Schneppenheim und Budde 2008).

Mit Hilfe verschiedener diagnostischer Methoden kann eine genaue Einteilung der Störung stattfinden. So werden bei der orientierenden Diagnostik nach der Anamnese, Methoden wie Messung der Blutungszeit oder Filtermethoden mit hohem Scherstress eingesetzt. Weiterhin werden in der erweiterten Diagnostik das VWF-Antigen sowie der Ristocetin-Cofaktor- und die FVIII-Aktivität bestimmt. Bei der speziellen Diagnostik wird unter anderem die VWF-Kollagen-, die VWF-GPIIb- oder die FVIII-Bindungsaktivität ermittelt sowie eine Multimeranalyse durchgeführt (Budde et al. 2002).

Eine Behandlung kann in bestimmten Fällen kurzfristig mit Desmopressin (DDAVP) erfolgen, was die Sekretion von VWF aus Endothelzellen stimuliert (Sabih und Babiker 2018). Weiterhin kann VWF durch entsprechende Plasmapräparate oder rekombinanten VWF ersetzt werden (Schneppenheim und Budde 2008).

### **1.6. Funktionelle Parameter der untersuchten VWF-Varianten**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten VWF-Varianten führen zu einem VWS Typ 2B und werden durch Mutationen in der A1-Domäne ausgelöst. Sie weisen eine erhöhte GPIIb $\alpha$ -Affinität auf, die eine verstärkte Bindung der VWF Multimere an die Thrombozyten zur Folge hat. Dadurch stehen der VWF und die Thrombozyten der Blutgerinnung nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung. In der Folge kann es zu einer Thrombozytopenie (Verlust von Thrombozyten im Blut) kommen. Dies sind gain-of-function Mutanten, die später mit den zwei etablierten Assays detektiert werden sollen (Rayes et al. 2010). Weiterhin wird bei einigen VWS Typ 2B Patienten ein erhöhter Abbau von VWF durch ADAMTS13 beobachtet. Dieser Vorgang soll mithilfe der hier etablierten Methoden genauer untersucht werden (Rayes et al. 2007).

Die Abgrenzung der VWS Typ 2B von den anderen Unterklassen erfolgt mit Hilfe verschiedener diagnostischer Methoden wie dem RIPA-Test (Ristocetin-induzierte Aggregation im plättchenfreien Plasma). Damit kann eine erhöhte oder verminderte Interaktion zwischen dem VWF und dem GPIIb $\alpha$ -Rezeptor nachgewiesen werden (Schneppenheim und Budde 2008). So hat z.B. nach Jong und Eikenboom die VWF

Variante **p.Val1316Met** eine sehr starke GPIIb $\alpha$ -Bindung ohne den Einsatz von Ristocetin. Der wtVWF dagegen zeigt bei dem Test erst bei hohen Ristocetin-Konzentrationen eine Aktivität (Jong und Eikenboom 2017). Des Weiteren kann nach Boender et al. eine relativ zuverlässige Abgrenzung der Typ 2B Unterklasse von Typ 2M und Typ 3 mit Hilfe des VWF:Ag-Tests (VWF-Antigen) erfolgen. Außerdem kann eine Eingrenzung aufgrund einer Multimeranalyse der VWF-Varianten stattfinden, da das Fehlen großer VWF-Multimere im Plasma in Verbindung mit dem erhöhten Auftreten von Abbaubanden ein Charakteristikum des VWS Typ 2B, aber auch Typ 2A ist. So weisen unter anderem **p.Val1316Met**, **p.Arg1308Cys** und **p.Arg1306Trp** eine geringe Anzahl an großen VWF-Multimeren, im Gegensatz zum Normalplasma auf. **P.Pro1266Leu** dagegen hat ein normales Multimermuster (Casonato et al. 2017). Eine genaue Unterscheidung zwischen Typ 2B und 2A kann nur über die GPIIb $\alpha$ -Bindung erfolgen, da bei Typ 2B eine erhöhte Affinität zum Rezeptor GPIIb $\alpha$  besteht. Hier kann dann wiederum nicht eindeutig zwischen VWS Typ 2B und platelet-type/pseudo VWS unterschieden werden, da bei Letzterem gain-of-function Mutationen in GPIIb $\alpha$  vorliegen, die zum selben Phänotyp führen.

Bei den sieben, hier untersuchten, VWF-Varianten liegen die folgenden Missense-Mutationen vor: **p.Pro1266Leu**, **p.Arg1341Gln**, **p.Arg1308Cys**, **p.Ala1461Asp**, **p.Val1316Met**, **p.Ile1309Val**, **p.Arg1306Trp**. Dabei erfolgt eine Basenpaarsubstitution, was zur Codierung einer anderen Aminosäure während der Translation führt.

Bei der VWF Mutante **p.MetDup1304** kommt es zur Insertion eines bereits vorhandenen Basentriplets, wodurch Methionin dupliziert wird.

Als Negativkontrolle soll die Doppelmutante **p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser** dienen. Diese wurde von Tobias Obser (Arbeitsgruppe (AG) Schneppenheim/Brehm) entwickelt, um eine nicht-spaltbare Variante von VWF für die Forschung zur Verfügung zu haben. Dabei handelt es sich um keine bekannte, humane VWF-Mutation. Bei der VWF-Variante handelt es sich ebenfalls um eine Basenpaarsubstitution, jedoch in zwei Bereichen auf dem VWF-Gen. Normalerweise kann die A2-Domäne beim wtVWF geöffnet werden, jedoch ist sie bei dieser Mutante über eine Disulfidbrücke permanent geschlossen, weshalb die Schnittstelle für ADAMTS13 nicht freigelegt und VWF nicht geschnitten werden kann (Baldauf et al. 2009).



### **1.7. Zielsetzung der Bachelorarbeit**

Mutationen innerhalb des *VWF*-Gens können den enzymatischen Abbau des VWF durch ADAMTS13 beeinflussen. Derzeit sind keine diagnostischen Assays zur Messung der Proteolyse von Aggregaten aus Thrombozyten und VWF-Varianten unter Flussbedingungen etabliert. Daher ist das zentrale Ziel der Bachelorarbeit, zwei entsprechende Assays zu entwickeln, um im Anschluss untersuchen zu können, ob ADAMTS13 in der Lage ist, 2B-VWF-Plättchen-Aggregate durch proteolytische Spaltung der VWF-Varianten unter Fluss aufzulösen. Die entwickelten Assays sollen die zwei physiologischen Bedingungen im Blut simulieren, unter denen VWF durch ADAMTS13 gespalten wird.

Mit Hilfe der zwei entwickelten Methoden soll zum einen die Funktionsweise der ADAMTS13 an oberflächengebundenem und zum anderen an zirkulierendem VWF unter Flussbedingungen untersucht werden.

Normalerweise werden adhärenente Endothelzellen stimuliert, um VWF-Fäden zu erhalten. In diesem System kann nur wtVWF untersucht werden. Um auch VWF-Mutanten erforschen zu können, soll ein zellfreies System etabliert werden. In einem Kanal-Slide sollen verschiedene Polystyrene Beads gebunden werden, um zu untersuchen, ob VWF an die Beads binden und Fäden bilden kann. Im Anschluss könnte dann überprüft werden, ob diese VWF-Fäden von wtADAMTS13 geschnitten werden.

Für die Simulation der Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Aggregate in der Blutzirkulation soll ein Light Transmission Aggregometer (LTA) verwendet werden. Zunächst soll getestet werden, ob man die VWF-Plättchen-Aggregate aus rekombinantem VWF und gewaschenen Thrombozyten mithilfe von Ristocetin erzeugen und ihr Entstehen mit dem LTA messen kann. Dann soll überprüft werden, ob die Aggregate durch rekombinante ADAMTS13 gespalten und die Reaktion aufgezeichnet werden kann. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode soll schließlich untersucht werden, ob zirkulierende Plättchenkomplexe mit VWF-2B-Varianten besser oder schlechter von ADAMTS13 gespalten werden als Komplexe mit wtVWF.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. HEK293 Zelllinie

Für die Expression von Wildtyp (wt) VWF, VWF-Mutanten sowie wtADAMTS13 wird die Zelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney) verwendet, da diese Zellen nicht von sich aus VWF und ADAMTS13 produzieren und hohe Proteinmengen herstellen können. Die Epithelzellen sind aus der Transformation von humanen, embryonalen Nierenzellen und Teilen des Adenovirus 5 entstanden, wodurch sie die Charakteristika einer Krebszelle haben. Dadurch verfügen die Zellen über eine unbegrenzte Teilungsrate und sind immortal.

**Tabelle 1:** Auflistung des verwendeten Kulturmediums und dessen Zusätze für die Kultivierung der HEK293 Zelllinie.

Medium/Lösung	Referenznummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X) + GlutaMAXX	31966-021	Gibco by life technologies
+ 10% FBS (Fetal Bovine Serum)	10270-106	Gibco by life technologies
+ 1% MEM NEAA (non-essential amino acid) (100X)	11140-035	Gibco by life technologies
+ 1% Anti-Anti (100X)	15240-062	Gibco by life technologies
+ 0,1% Gentamicin Sulfat	17-518Z	Lonza

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

##### 2.2.1.1. Auftauen von HEK293 Zellen

Vor dem Auftauen der Zellen werden das Kulturmedium mit der Zusammensetzung wie in **Tabelle 1** beschrieben sowie DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die HEK293 Zelllinie liegt bei -196°C im flüssigen Stickstoff kryokonserviert vor. Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank werden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in einem 15 mL Tube in 9 mL vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und bei 200 xg für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Dabei wird das DMSO (Dimethylsulfoxid), welches beim Einfrieren verwendet wird, um der zellschädigenden Eiskristallbildung entgegen zu wirken, entfernt. Nach

der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet im Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine T175 Zellkulturflasche überführt und auf 45 mL mit Kulturmedium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, bis die Zellen 95-100% konfluent sind.

#### **2.2.1.2. Zellkultur und Zellpassagieren**

Mit Passagieren wird der Vorgang bezeichnet, bei dem Zellen nach Erreichen einer gewissen Konfluenz in der Zellkulturflasche abgelöst, verdünnt und anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt werden. Damit die Zellkultur kontaminationsfrei in eine neue Flasche überführt werden kann, wird unter der sterilen Werkbank mit einer laminaren Strömung gearbeitet. Vor und nach jedem Gebrauch ist das Reinigen mit Hilfe eines Desinfektionsmittels notwendig.

Die Zellen werden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen drei bis vier Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Unter dem Mikroskop werden die Zellen zunächst auf ihre Dichte und Morphologie hin untersucht. Bei Erreichen einer Konfluenz von 95-100% werden die Zellen passagiert. Die verwendeten Lösungen werden vor dem Gebrauch im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Das verbrauchte Medium wird vorsichtig abgekippt und anschließend werden die Zellen mit 10 mL DPBS gewaschen. Damit sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, werden 3 mL Trypsin auf die Zellen gegeben und für 30 Sekunden inkubiert. Anschließend wird mit 7 mL Kulturmedium nach **Tabelle 1** resuspendiert. Abhängig von der benötigten Zelldichte bis zur Verwendung der Kultur, wird eine definierte Menge an Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und auf 45 mL mit Kulturmedium aufgefüllt. Die anschließende Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

#### **2.2.1.3. Herstellung von rekombinanten Proteinen in HEK293 Zellen**

Der untersuchte wtVWF sowie die VWF-Mutanten und wtADAMTS13 wurden teilweise während des Praxissemesters und im Rahmen der Bachelorarbeit produziert.

Für die Expression eines Proteins wird der entsprechend benötigte Vektor mit der cDNA in HEK293 Zellen stabil transfiziert, was von der AG Brehm durchgeführt wird.

Nach der Aussaat der transfizierten HEK293 Zellen in einer T175 Zellkulturflasche erfolgt die Kultivierung bis zu einer Konfluenz von 95-100% im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Entsprechend dem Zellpassagieren (**Abschnitt 3.2.1.2**) werden die Zellen auf 12 T175 Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierfür werden die HEK293 Zel-

len mit 10 mL DPBS gewaschen und mit 3 mL Trypsin für 30 Sekunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 7 mL Kulturmedium (**Tabelle 1**) resuspendiert.

Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und Dichte der Zellen werden 7 bis 10 mL Zellsuspension in eine neue Medienflasche (**Tabelle 1** jedoch ohne NEAA) überführt und gemischt. Die 565 mL Zellsuspension werden auf 12 T175 Zellkulturflaschen mit jeweils 47 mL aufgeteilt. Die anschließende Kultivierung erfolgt in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt für drei bis vier Tage bis zu einer Konfluenz von 85%.

Das enthaltene FBS in dem Kulturmedium interagiert mit dem VWF sowie ADAMTS13, daher wird das Medium durch serumfreies Medium (SFM) ersetzt. Dabei wird das Kulturmedium aus den T175 Zellkulturflaschen entfernt und mit 10 mL DPBS gewaschen. Anschließend wird mit 20 mL SFM aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt für drei bis vier Tage inkubiert.

Die HEK293 Zellen sezernieren das entsprechende Protein in das Medium, sodass die Zellen verworfen und das proteinhaltige Medium aus den 12 Zellkulturflaschen auf 50 mL Tubes verteilt wird. Um verbleibende Zellreste zu entfernen, wird das Medium bei 4°C für 10 Minuten bei 1.363 xg zentrifugiert. Der Überstand wird in neue 50 mL Tubes überführt. Bevor die Proteine genutzt und eventuell konzentriert werden können, muss die Konzentration ermittelt werden. Dazu wird bei VWF ein VWF-ELISA und bei ADAMTS13 ein ADAMTS13-ELISA durchgeführt.

#### **2.2.1.4. Einfrieren von HEK293 Zellen**

Bei einer Konfluenz von 95% werden die Zellen mit 10 mL DPBS gewaschen. Anschließend erfolgt das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche für 30 Sekunden mit 3 mL Trypsin. Danach wird auf 10 mL Kulturmedium nach der Zusammensetzung aus **Tabelle 1** aufgefüllt. Die Zellsuspension wird in ein 15 mL Tube überführt und für 5 Minuten bei 200 xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in 4 mL Einfriermedium resuspendiert, welches aus 10% FBS und 90% DMSO besteht. Um einen Kälteschock zu vermeiden und ein langsames Einfrieren zu gewährleisten, wird jeweils 1 mL Zellsuspension in ein Kryotube überführt und in einer Einfrierbox mit Isopropanol bei -80°C eingefroren. Nach zwei Tagen erfolgt die Überführung in Flüssigstickstoff bei -196°C.

## **2.2.2. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Konzentrierung von rekombinanten Proteinen**

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird auf die benötigte Menge und Konzentration konzentriert. Dazu werden für die Protease ADAMTS13 Zentrifugenröhrchen mit einer Filtermembran und einem Größenausschluss von 30 kDa und für VWF Filter mit einem Größenausschluss von 100 kDa verwendet. Die Konzentrierungseinheiten werden mit dem proteinhaltigen Medium befüllt und bei 3.846 xg 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dabei wird das Protein vom Medium isoliert, indem es von der Membran zurückgehalten wird. Der Durchlauf wird verworfen und das Röhrchen wird mit dem proteinhaltigen Medium erneut befüllt und bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Dabei wird der Vorgang solange wiederholt, bis das gewünschte Volumen an konzentriertem Protein erreicht ist. Anschließend wird die Filtermembran mit dem Proteinkonzentrat gespült und in ein 15 mL Tube überführt. Um ausgefallene Proteine zu entfernen, wird bei 1.363 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wird Proteaseinhibitor hinzugegeben, um den Abbau der Proteine zu verhindern. Es folgt eine erneute Konzentrationsbestimmung. Das Konzentrat wird aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2.2. ADAMTS13-ELISA**

Für die Konzentrationsbestimmung der wtADAMTS13 wird ein ADAMTS13-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, welches nach der Anleitung des Herstellers nach dem Kit IMUBIND ADAMTS13 ELISA erfolgt. Dabei handelt es sich um einen Sandwich ELISA. Es wird ein spezifisches Antigen mittels eines Antikörpers gebunden, wobei der Erstantikörper den Zweitantikörper markiert, sodass er daraufhin durch einen forcierten Farbumschlag detektiert und quantifiziert werden kann.

Die zu messenden Proben werden, abhängig von der ungefähren Konzentration, im Testpuffer verdünnt und für die Dreifachbestimmung werden jeweils 100 µL in drei Wells einer bereits mit Antikörpern beschichteten 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Der Standard wird seriell auf die Konzentrationen 100 ng/mL bis 3,12 ng/mL verdünnt und ebenfalls 100 µL auf die beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Von der Positivkontrolle, welche einem 1:10 verdünnten Normalplasma entspricht, sowie von der Negativkontrolle (Testpuffer) werden je 100 µL auf die Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Platte wird mit einer Azetat-Abdeckfolie bedeckt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Danach wird die Platte viermal mit Waschpuffer (1% BSA (Bovine Serum Albumin) in DPBS) gewaschen und 100 µL Detektionsantikörper (rabbit anti-human ADAMTS13 Antikörper) mit einer 1:100 Verdünnung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit der Azetat-Abdeckfolie bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µL des 1:100 verdünnten Enzymkonjugates auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Erneut wird mit der Azetat-Abdeckfolie bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer werden 100 µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA hinzugegeben und für ca. zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei entsteht ein blauer Farbumschlag, da die an dem Detektionsantikörper gekoppelte Peroxidase das TMB zu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine oxidiert. Um die Reaktion abzuhalten, werden 50 µL 0,5 molarer Schwefelsäure in jedes Well pipettiert, wobei es zu einem gelben Farbumschlag kommt. Dabei ist die Intensität der Farbe abhängig von der Höhe der Proteinkonzentration, welche mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm im Zusammenhang mit der Standardreihe bestimmt werden kann.

### **2.2.2.3. VWF-ELISA**

Für die Konzentrationsbestimmung der hergestellten sowie konzentrierten VWF-Varianten, wird ein VWF-ELISA durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Sandwich ELISA, bei dem zweimal ein polyklonaler Antikörper (Beschichtungs- und Detektionsantikörper) verwendet wird und spezifisch an diversen Epitopen des VWF binden.

Zunächst wird die Mikrotiterplatte mit dem Beschichtungsantikörper inkubiert. Dabei wird ein polyklonaler rabbit anti-human VWF Antikörper (AK) 1:1.000 in 10 mL Beschichtungspuffer verdünnt, wovon 100 µL pro Well pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wird der überschüssige AK entfernt und die Platte viermal mit dem Waschpuffer mit jeweils 200 µL pro Well gewaschen.

Anschließend wird der Standard (gepooltes humanes Plasma) seriell aus einer 1:50 Verdünnung im Probenpuffer verdünnt und 100 µL pro Well pipettiert. Die Proben werden ebenfalls im Probenpuffer angesetzt und 100 µL pro Well pipettiert, wobei die

benötigte Verdünnung abhängig von der Probe ist. Die Konzentrationsbestimmung der Proben läuft immer über eine Dreifachbestimmung ab. Die beschichtete Platte wird bei 37°C für eine Stunde im Brutschrank inkubiert und anschließend viermal mit jeweils 200 µL Waschpuffer gewaschen.

Danach wird der Detektionsantikörper, ein polyklonaler rabbit anti-human VWF, gekoppelt mit Horseradish peroxidase (HRP), 1:2.000 in 1% BSA in DPBS verdünnt und 100 µL pro Well pipettiert. Die Inkubation verläuft eine Stunde bei 37°C im Brutschrank. Nach wiederholtem Waschen mit viermal 200 µL Waschpuffer pro Well werden 100 µL TMB Liquid Substrate System for ELISA hinzugegeben und für ca. zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es findet eine Farbreaktion statt, die mit 50 µL 0,5 molarer Schwefelsäure gestoppt wird, welches einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkt. Die Intensität der Farbe ist abhängig von der Proteinkonzentration und wird mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm im Zusammenhang mit der Standardreihe bestimmt.

#### **2.2.2.4. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen**

Für die Erforschung von VWF-Mutanten soll ein zellfreies System etabliert werden. Damit soll überprüft werden, ob unter Flussbedingungen ADAMTS13 in der Lage ist 2B-VWF-Fäden zu spalten.

##### **2.2.2.4.1. Protein-Kopplung an carboxylierte Polybeads**

Für die Bildung von VWF-Fäden unter Fluss in einem zellfreien Assay sind Ankerpunkte für den VWF notwendig. Dafür werden unter anderem carboxylierte Polybeads (Polystyrol-Kügelchen) verwendet, die entweder Kollagen oder einen rabbit anti-human VWF Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Diese werden mit Hilfe des PolyLink Protein Coupling Kits nach der Anleitung gekoppelt.

Zunächst werden die carboxylierten Polybeads gewaschen. Dafür werden 12,5 mg Beads bei 750 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 400 µL PolyLink Coupling Puffer resuspendiert. Bei gleichen Einstellungen wird erneut zentrifugiert und das Pellet in 170 µL Coupling Puffer resuspendiert.

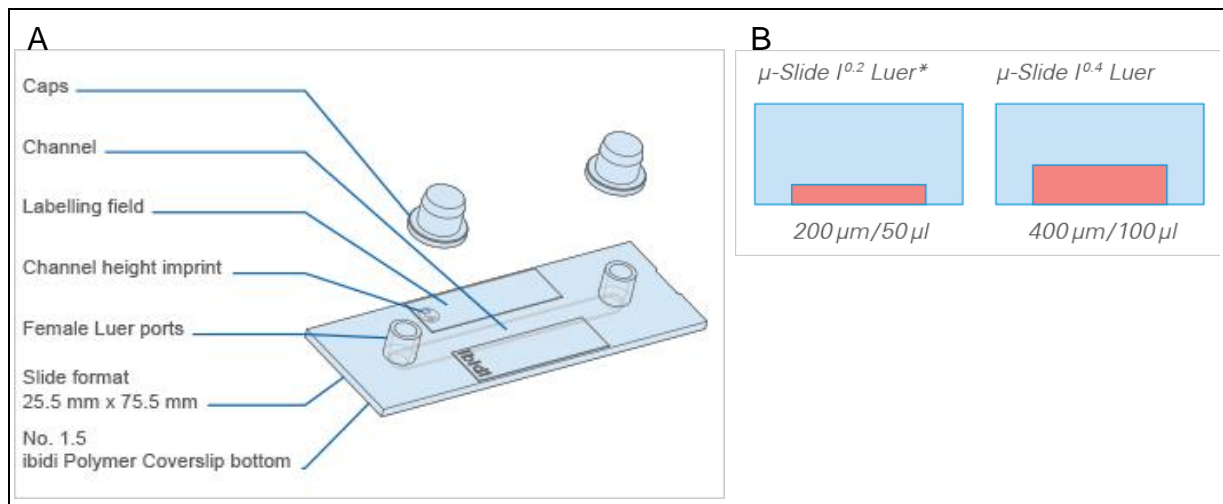
Unter dem Abzug werden 10 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDAC) (Endkonzentration 200 mg/mL) mit 50 µL Coupling Puffer vermengt, 20 µL der Beads hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

An die Beads werden entweder rabbit anti-human VWF Antikörper (200 µg) oder Kollagen Typ I (500 µg) gebunden (in der Folge anti-VWF-Beads oder Kollagen-Beads genannt). Diese entsprechenden Proteine werden zu den Beads zugegeben und für 5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Beads gewaschen. Dafür wird bei 750 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 400 µL Waschpuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei gleichen Einstellungen wird das Pellet in 400 µL resuspendiert und bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

#### **2.2.2.4.2. Verschiedene Beschichtungen eines Kanal-Slides**

Für die Bildung von VWF-Fäden im Kanal-Slide für ein zellfreies Assay, werden bei der Entwicklung der Methode µ-Sticky-Slides<sup>0,2</sup> Luer oder µ-Slides<sup>0,4</sup> Luer (Ibidi) mit unterschiedlichen Reagenzien beschichtet. Kanal-Slides von Ibidi finden normalerweise in der Zellkultur Verwendung und können an ein Perfusion Set und eine Pumpe angeschlossen und mikroskopiert werden (**Abbildung 5**). Die Kanal-Slides sind mit verschiedenen Beschichtungen und in unterschiedlichen Größen erhältlich. Der Boden des verwendeten µ-Slide<sup>0,4</sup> Luer besteht aus Polymeren und ist mit einer speziellen für die Zellkultur entwickelten Beschichtung (ibidiTreat) überzogen (die exakte Zusammensetzung wird von Ibidi geheim gehalten). Das µ-Sticky-Slide<sup>0,2</sup> Luer ist ein bodenloser Kanal mit Kleberändern, der mit unterschiedlich beschichteten Coverslips kombiniert werden kann. Bei der vorgelegten Arbeit werden Coverslips aus Glas verwendet, da diese Hitze unempfindlich sind (**Abbildung 4**).





**Abbildung 4: Ibsidi Kanal-Slide mit dessen Größenbeschreibung.** (A) zeigt den Aufbau eines Ibsidi Kanal-Slides mit dessen Bestandteilen, speziell mit einem Coverslip. In (B) wird die Größe eines  $\mu$ -Slide<sup>0.2</sup> Luer und  $\mu$ -Slide<sup>0.4</sup> Luer dargestellt. (Ibsidi GmbH 2018).

Für eine bessere Übersichtlichkeit werden die verschiedenen Beschichtungen der Kanal-Slides durchnummeriert:

- I. Es wird mit Kollagen Typ I und Typ III, sowie Fibrinogen mit einer Endkonzentration von jeweils 200  $\mu$ g/mL beschichtet. Davon werden 100  $\mu$ L in ein Sticky-Slide pipettiert, das vorab auf ein Glas-Coverslip geklebt wurde, und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank oder über Nacht bei RT inkubiert.
- II. Ein Sticky-Slide wird mit verschiedenen großen Polystyrenen Beads (25  $\mu$ m und 90  $\mu$ m Durchmesser) beschichtet. Dabei wird das Coverslip für die Sticky-Slides mit Klebeband abgeklebt, sodass nur die Stelle für den Kanal frei bleibt. Anschließend werden die Beads in unterschiedlichen Konzentrationen auf 100  $\mu$ L in 100% Ethanol verdünnt und auf die freie Region des Coverslips pipettiert. Damit die Beads an dem Coverslip haften bleiben, werden diese auf einer Heizplatte bei einer Temperatur von 98°C für einige Minuten angeschmolzen und anschließend das Klebeband entfernt und das Sticky-Slide aufgeklebt.
- III. In ein Sticky-Slide mit Glasboden werden 100  $\mu$ L an verdünnten Polystyrene Beads in 100% Ethanol pipettiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert, damit das Ethanol verdunstet und die gleichmäßige Verteilung der Beads sichergestellt werden kann. Danach werden auch hier die Beads auf der Heizplatte bei ca. 98°C für einige Minuten angeschmolzen und anschließend mit 3 mL DPBS gewaschen.

- IV. Polystyrene Beads sowie anti-VWF-Beads werden in 100% Ethanol verdünnt und davon 100  $\mu$ L in ein Sticky-Slide mit Glasboden pipettiert. Im nächsten Schritt wird das Ethanol auf der Heizplatte bei 98°C herausgekocht.
- V. Ein  $\mu$ -Slide<sup>0,4</sup> Luer wird mit einem rabbit anti-human VWF Antikörper beschichtet, an dem zuerst wtVWF und anschließend anti-VWF-Beads gebunden werden (**Abbildung 11 (A)**). Dafür wird der Antikörper in Carbonatpuffer 1:1.000 verdünnt und im Kanal-Slide eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgt das Waschen des Slides mit 3 mL PBS. Anschließend wird die Stocklösung des rekombinanten VWF (hergestellt von der AG Brehm) auf 100% der normalen VWF-Plasmakonzentration (10  $\mu$ g/mL) in DPBS verdünnt und in das Slide pipettiert. Nach einer Stunde bei 37°C im Brutschrank wird das Slide erneut mit DPBS gewaschen. Zum Schluss werden anti-VWF-Beads 1:6 in DPBS verdünnt, in das Kanal-Slide pipettiert und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- VI. Ein  $\mu$ -Slide<sup>0,4</sup> Luer wird mit einem goat anti-rabbit Antikörper beschichtet. Dieser wird 1:1.000 im Carbonatpuffer verdünnt, in das Kanal-Slide pipettiert und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag werden rabbit anti-VWF-Beads 1:6 in DPBS verdünnt, in das Kanal-Slide pipettiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- VII. Die Kopplung von Kollagen Typ I sowie rabbit anti-human VWF Antikörper an carboxylierte Beads erfolgt direkt im Kanal-Slide. Dafür werden die Beads 1:10 in 100% Ethanol verdünnt, in das Slide gegeben und für zwei Minuten auf der Heizplatte bei 98°C angeschmolzen. Danach werden 100  $\mu$ L EDAC (Endkonzentration 50 mg/ml) in Kopplungs-Puffer aus dem Kit in das Kanal-Slide pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit auf dem Wipptisch werden 50  $\mu$ L rabbit anti-human VWF Antikörper (Endkonzentration 200 mg/mL) oder Kollagen Typ I (Endkonzentration 500  $\mu$ g/mL) hinzu pipettiert und 4 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Zum Schluss wird das Slide mit 400  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen.
- VIII. Ein  $\mu$ -Sticky-Slide<sup>0,2</sup> Luer und ein  $\mu$ -Slide<sup>0,4</sup> Luer werden mit Kollagen-Beads beschichtet. Hierfür werden 100  $\mu$ L Beads (1:6 Verdünnung in PBS) in die Kanal-Slides pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Slides mit 3 mL DPBS gespült.

#### **2.2.2.4.3. Herstellung von GPIIb $\alpha$ -Latexbeads**

Zum Nachweis von VWF-Fäden werden GPIIb $\alpha$ -Latexbeads aus dem Kit Innovance VWF Ac verwendet. Dafür werden 1 mL des Reagenz I (Latexbeads, die einen mouse anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörper tragen) mit 416  $\mu$ L des Reagenz III (GPIIb $\alpha$ -Peptid) zusammen pipettiert und für eine Stunde bei 4°C unter Schwenken inkubiert und anschließend bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

#### **2.2.2.4.4. Nachweisreaktionen**

Für den Nachweis, dass die Kopplung des rabbit anti-human VWF Antikörpers an carboxylierte Beads stattgefunden hat und dieser durch die Hitze nicht zerstört wurde, werden die gekoppelten Beads 1:5 in 100% Ethanol verdünnt und in ein Sticky-Slide pipettiert. Anschließend werden die Beads bei 98°C auf der Heizplatte für 4 Minuten an das Glas-Coverslip angeschmolzen und mit 3 mL DPBS durchgespült.

Ein Sekundärantikörper (goat anti-rabbit-HRP, 1:2.000 Verdünnung) wird in das Sticky-Slide hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es folgt das Spülen mit 3 mL DPBS und anschließend mit 300  $\mu$ L TMB. Der Nachweis der Kopplung ist bestätigt, wenn ein blauer Farbumschlag entsteht.

Des Weiteren wurde eine Nachweisreaktion der AK-Kopplung an die carboxylierten Beads im Reaktionsgefäß durchgeführt. Dafür wurden die Beads 1:6 in 1% BSA in DPBS verdünnt, ein goat anti-rabbit-HRP AK (1:500 Verdünnung) hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige AK herausgewaschen, indem das Reaktionsgefäß dreimal 5 Minuten bei 750 xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 100 mL DPBS resuspendiert wurde. Nach dem 3. Zentrifugationsschritt werden 50  $\mu$ L TMB hinzugegeben. Erfolgt ein Farbumschlag zu blau, ist der Nachweis erbracht, dass der AK an die Beads gekoppelt ist.

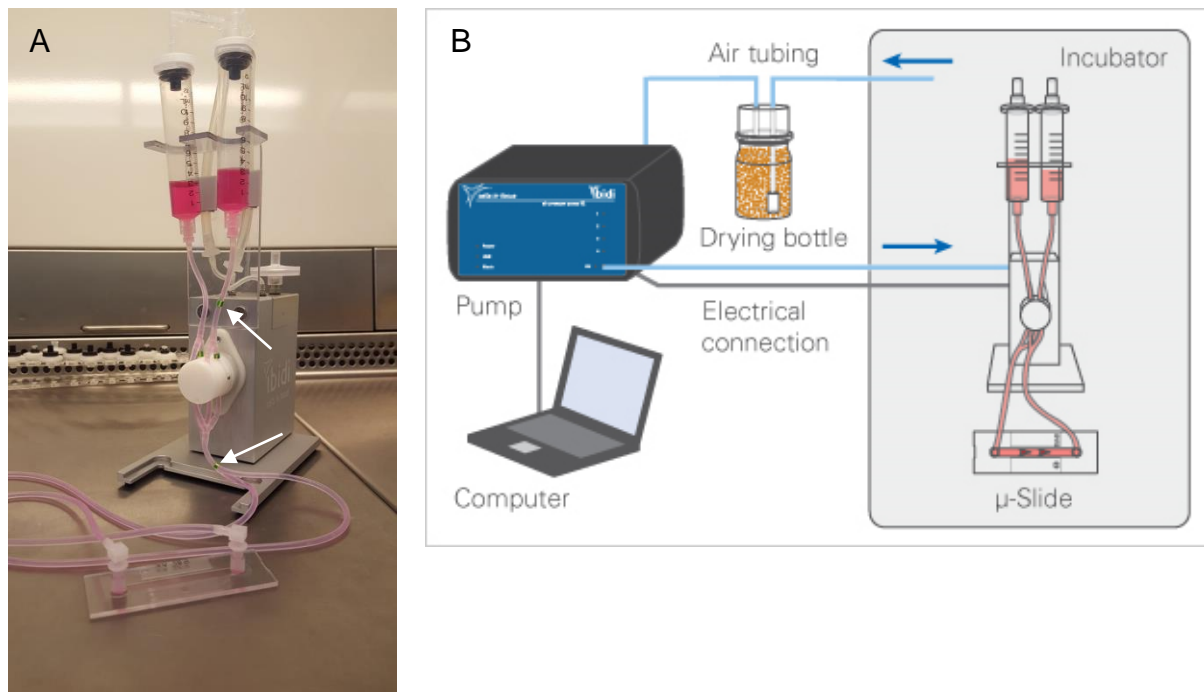
#### **2.2.2.4.5. Beschreibung des Flusssystems und dessen Anwendung**

Für die Flussversuche mit den verschiedenen Beschichtungen des Kanal-Slides werden in das Reservoir des Pumpsystems (**Abbildung 5**) 6 mL DPBS und 100% Plasmakonzentration wtVWF (Endkonzentration 10  $\mu$ g/mL) hinzugegeben. Die gebildeten VWF-Fäden können erst mit dem Einsatz von GPIIb $\alpha$ -Latexbeads sichtbar gemacht werden, da die Beads wie Blutplättchen (Thrombozyten) auf ihrer Oberfläche das Glycoprotein Ib (GPIIb $\alpha$ ) tragen. Dieses bindet an eine Bindungsstelle in der A1-

Domäne des VWF, wodurch die VWF-Fäden sichtbar werden. Daher werden 100  $\mu\text{L}$  Latexbeads zugefügt. Abhängig vom Flussversuch können noch weitere Zusätze erfolgen. Unter anderem werden Sephacryl Beads verwendet. Diese sind in 20% Ethanol gelagert und müssen vor der Verwendung zuerst mit DPBS gewaschen werden. Dafür werden die Sephacryl Beads dreimal bei 200  $\times g$  1,5 Minuten zentrifugiert und mit DPBS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Zuerst wird das System von Luftblasen befreit, indem es an eine Pumpe angeschlossen wird. Bei einem Druck von 40 mbar werden die Luftblasen aus den Schläuchen entfernt. Anschließend wird das Slide mit dem Pumpsystem verbunden und in ein Fluoreszenzmikroskop gelegt. Dabei wird die Feuchtekammer des Mikroskops auf 5%  $\text{CO}_2$  und 37°C gebracht. Das Pumpsystem wird für das Warmhalten des Mediums in einen Stage Heater bei 37°C gestellt.

Das Herüberströmen des VWF über das beschichtete Kanal-Slide erfolgt bei unterschiedlichen Flusseinstellungen, welche abhängig von der jeweiligen Beschichtung und der Größe des Kanal-Slides sind.



**Abbildung 5: Aufbau des Ibidi Pumpsystems.** (A) zeigt das Ibidi Flusssystem mit dem Perfusion Set (die gelb/grüne Markierung bedeutet 50 cm-Schläuche mit einem Durchmesser von 1,6 mm), befüllt mit Kulturmedium. Dieses ist angeschlossen an ein Kanal-Slide. In (B) wird der schematische Aufbau des Flusssystems, angeschlossen an das Pumpsystem, dargestellt. (Ibidi GmbH 2018).

VWF-Fäden werden durch Proteolyse mittels ADAMTS13 abgebaut. Hierfür wird wtADAMTS13 (Endkonzentration 1.000 ng/mL) in das Reservoir der Fluidic Unit hinzugegeben. Diese wird vorher bei Raumtemperatur aufgetaut, mit  $\text{BaCl}_2$  (Endkon-

zentration 10 mM) vermischt und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C aktiviert. Die Aufzeichnung der Proteolyse erfolgt durch die Aufnahme gleicher Bildausschnitte in einem Abstand von 36 Sekunden. Insgesamt werden 20 Aufnahmen in 684 Sekunden aufgenommen.

#### **2.2.2.4.6. Immunfluoreszenz**

Nachdem die verschiedenen Flussversuche durchgeführt worden sind, kann eine Immunfluoreszenz erfolgen, um VWF nachzuweisen. Diese wird bei Bedarf im Rahmen der Flussversuche folgendermaßen durchgeführt: In die Reservoirs des Pumpsystems werden 3 µL polyklonaler rabbit anti-human VWF AK hinzugegeben. Abhängig davon, ob VWF oder Latexbeads fluoreszieren sollen, fällt die Wahl des Sekundärantikörpers aus. Der rabbit anti-VWF AK wird mit einem anti-rabbit AK, der mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt ist markiert. Die Latexbeads, die einen mouse anti-GPIIb $\alpha$  tragen, werden mit einem anti-mouse AK, der mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 546 gekoppelt ist nachgewiesen. Dafür werden in die Reservoirs des Pumpsystems 6 µL des entsprechenden AKs pipettiert. Aufgrund des Flusses werden die AKs in das Kanal-Slide gespült, wo diese am VWF bzw. den Latexbeads binden.

Die Detektion erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), mithilfe des GFP-Filters (grün, wtVWF) und des TRITC-Filters (rot, Latexbeads).

#### **2.2.2.5. Light Transmission Aggregometry (Lichttransmissionsaggregometrie)**

Für die Simulation der Proteolyse frei zirkulierender VWF-Plättchen-Komplexe soll ein Light Transmission Aggregometer (LTA) verwendet werden.

##### **2.2.2.5.1. Tests mit GPIIb $\alpha$ -Latexbeads und wtVWF**

Für die Messung der Komplexbildung in einem zellfreien Assay mit dem LTA werden zunächst in der Glasküvette auf ein Gesamtvolumen von 500 µL in PBS, 100 µL GPIIb $\alpha$ -Latexbeads und 100% Plasmakonzentration wtVWF (Endkonzentration 10 µg/mL) zusammengeführt und unter Scherfluss, der durch die Verwendung eines Magnetrührers erzeugt wird, gemessen. Nach Starten der Messung wird die Basislinie festgesetzt. Für die Ausbildung der Komplexe wird Ristocetin (Endkonzentration 0,6 mg/mL) hinzugegeben.

Durch die Ausbildung der Komplexe sollte die Trübung und damit die Turbidität abnehmen. Im Falle einer Komplexbildung könnte wtADAMTS13 (Endkonzentration 1.000 ng/mL) hinzugegeben werden. Diese wird vorher bei Raumtemperatur aufgetaut, mit BaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 10 mM) vermischt und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C aktiviert.

Die Reaktion wird für eine Stunde aufgezeichnet.

#### **2.2.2.5.2. Isolierung von Plättchen aus einem Buffy-Coat**

Die Blutplättchen (Thrombozyten) werden aus einem Buffy-Coat isoliert, welches bei der Blutplasmaherstellung aus einer Blutspende zurückbleibt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Sven Peine (Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)). Während der Isolierung der Thrombozyten aus dem Buffy-Coat wird das restliche Blutplasma, mit den Proteinen wie VWF, restlos entfernt, da sich diese im Versuch ansonsten als Störkomponente auswirken würden. Bei der Zentrifugation dient der zelluläre Blutbestandteil, das Hämatokrit, als "Bett", damit die Thrombozyten nicht heruntergedrückt und beschädigt oder voraktiviert werden. Bei der Aufreinigung muss langsam und vorsichtig gearbeitet werden, damit die Thrombozyten nicht aktiviert werden. Dafür wird zum einen mit einem Ca-freiem Tyrode's Puffer mit einem niedrigen pH von 6,5 gewaschen und zum anderen Apyrase (Stockaktivität 1.000 U/mL) zur Unterdrückung der Aktivität eingesetzt.

Es werden 60 mL des Buffy-Coats auf zwei Zentrifugenröhrchen gleichmäßig verteilt und mit Ca-freiem Tyrode's Puffer (pH 6,5) auf 50 mL aufgefüllt. Es folgt die Zugabe von 32,5 µL Apyrase (Endkonzentration 0,65 µL/mL). Die Apyrase wird bei jedem weiteren Waschriff um die Hälfte der Konzentration reduziert. Der Buffy-Coat wird für 15 Minuten bei 23°C und 1.589 xg zentrifugiert, dabei wird die Bremse der Zentrifuge auf Stufe vier herunterreduziert, damit die Plättchen nicht aufgewirbelt werden. Nach der Zentrifugation kommt es zur Ausbildung von drei Phasen, dem Hämatokrit, den Thrombozyten und dem proteinhaltigen Überstand. Der Überstand wird mit einer 6 mL Transferpipette vorsichtig entfernt und mit Ca-freiem Tyrode's Puffer auf 30 mL aufgefüllt. 9,75 µL (0,325 µL/mL) Apyrase werden hinzugegeben und vorsichtig geschwenkt, sodass die Plättchen inaktiviert bleiben. Anschließend wird bei gleichen Einstellungen zentrifugiert und der Vorgang wiederholt, wobei die Apyrase wieder auf die Hälfte reduziert wird, und zwar auf 4,88 µL (0,163 µL/mL). Im vierten Zentrifugati-

onsschritt wird auf 30 mL mit dem Ca-freiem Tyrode´s Puffer aufgefüllt, jedoch ohne die Zugabe von Apyrase.

Anschließend folgt die Isolierung der Plättchen mittels Plättchenresuspensionspuffers. Dieser wird aus dem Ca-freiem Tyrode´s Puffer angesetzt und enthält zusätzlich 5% BSA mit einem pH-Wert von 7,4. Dieser pH-Wert entspricht dem des Blutes, weshalb hierbei sehr vorsichtig gearbeitet werden muss, damit die Plättchen inaktiv bleiben. Dabei wird das Pellet nach dem vierten Zentrifugationsschritt auf 40 mL mit Plättchenresuspensionspuffer aufgefüllt und 7 Minuten bei 314 xg zentrifugiert.

Der trübe Überstand enthält die Thrombozyten und wird langsam in ein neues Tube überführt. Danach wird die Plättchenzahl mit einem Zellzählgerät (Sysmex) bestimmt und für die Versuche auf  $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$  mit Plättchenresuspensionspuffer eingestellt.

#### **2.2.2.5.3. Messung der Plättchenaktivität**

Um zu prüfen, ob die Plättchen während der Isolierung ungewollt voraktiviert wurden, werden zunächst 500  $\mu\text{L}$  einer Suspension mit  $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$  in eine Glasküvette mit einem Magnetrührer gegeben. Wenn nach einigen Minuten keine Aggregation der Plättchen stattfindet, wird 1 mM  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben und weitere 10 Minuten gewartet. Bei inaktiven Plättchen, die keine Aggregation bei diesen nicht-stimulierenden Bedingungen zeigen, kann der Versuch gestartet werden.

#### **2.2.2.5.4. Messung der Bildung und des Abbaus von Plättchen-VWF-Komplexen mittels LTA**

Für die Messung der Komplexbildung aus VWF und Plättchen mit dem LTA werden zunächst in einer Glasküvette mit Magnetstäbchen,  $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$  und  $\text{CaCl}_2$  (Endkonzentration 1 mM) zusammengeführt. Durch den eingebauten Magnetrührer kann im LTA unter Scherfluss gemessen werden. Nach Starten der Messung wird die Basislinie festgesetzt und VWF (Endkonzentration 100% = 10  $\mu\text{g/mL}$ ) hinzugegeben.

Durch die Ausbildung der Komplexe nimmt die Trübung (Turbidität) ab. Geschieht dies nach einer Minute noch nicht, wird Ristocetin zur Komplexbildung hinzugegeben. Nach 12 Minuten wird wtADAMTS13 (Endkonzentration 1.000 ng/mL) hinzugegeben. Diese wird vorher bei Raumtemperatur aufgetaut, mit  $\text{BaCl}_2$  (Endkonzentration 10 mM) vermischt und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C aktiviert. Das Gesamtvolumen beträgt 600  $\mu\text{L}$ .

Zur Untersuchung der Proteolyse der VWF-Plättchen-Komplexe wird die Turbidität insgesamt für eine Stunde aufgezeichnet.

#### **2.2.2.5.5. Datenauswertung**

Die Auswertung der Turbiditätskurven wurde mit dem Programm Graph Pad Prism Version 7.05 durchgeführt. Die mit dem LTA aufgenommenen Werte wurden für die bessere Vergleichbarkeit und Auswertung geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.

Des Weiteren wurde die Steigung im ausgewählten Bereich der Einzelgraphen mit Excel ermittelt. Dazu wurde eine lineare Trendlinie durch die Messwerte der Einzelgraphen gelegt, wobei der erste Wert der Formel die Steigung angibt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Einzelsteigungen für die Dreifachbestimmung berechnet.



### 3. Ergebnisse

Für die Messung der Proteolyse von VWF-2B-Varianten unter Flussbedingungen sollten zwei diagnostiktaugliche Assays entwickelt werden. Dabei sollte die Funktionsweise der ADAMTS13 zum einem an oberflächengebundenem und zum anderen an zirkulierendem VWF unter Flussbedingungen untersucht werden.

Üblicherweise werden adhärente Endothelzellen stimuliert, um VWF-Fäden zu erhalten. Die Nutzung von Primärzellen ist allerdings für einen diagnostischen Test zu aufwendig und zudem kann mithilfe dieser Zellen nur den Wildtyp von VWF untersucht werden. Da es das Ziel ist mit dem Assay ebenfalls VWF-Mutanten auf ihre Proteolyse durch ADAMTS13 zu erforschen, sollte ein zellfreies System entwickelt werden. Dafür wurden Kanal-Slides mit verschiedenen Reagenzien beschichtet und außerdem erforscht, woran VWF binden und Fäden bilden kann.

Für die Simulation der Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Komplexe in der Blutzirkulation sollte ein LTA verwendet werden.

#### 3.1. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen

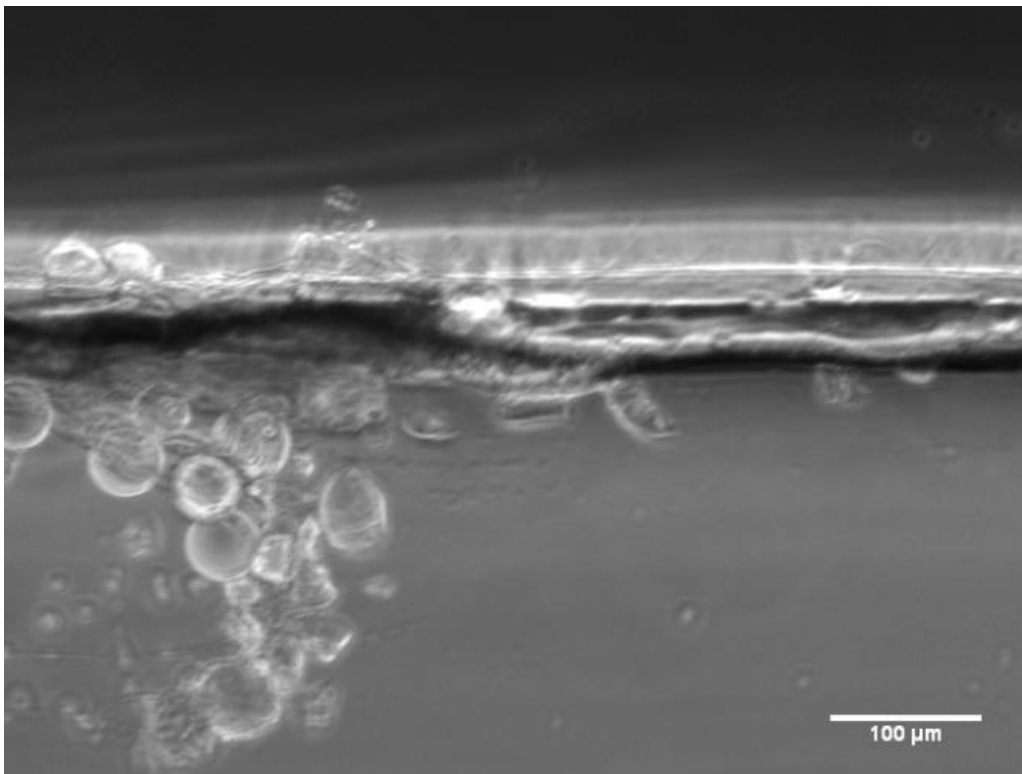
Üblicherweise werden adhärente Endothelzellen stimuliert, um VWF-Fäden zu erhalten. In dieser Versuchsreihe sollte jedoch für die Untersuchung der Spaltung von VWF-Fäden auf einer Oberfläche ein zellfreies System entwickelt werden. Hierzu wurden Kanal-Slides mit verschiedenen Reagenzien beschichtet (**Abschnitt 2.2.2.4.2**), um zu untersuchen, woran VWF binden und Fäden bilden kann. Im Anschluss sollte überprüft werden, ob diese VWF-Fäden von der Protease ADAMTS13 geschnitten werden können.

Nach einer Gefäßverletzung bindet VWF bei erhöhtem Scherfluss während der primären Hämostase an das freiliegende Kollagen und kann anschließend Thrombozyten rekrutieren. Des Weiteren ist bekannt, dass VWF an Fibrinogen binden kann. Daher wurden zunächst  $\mu$ -Sticky Slides<sup>0,2</sup> Luer mit Kollagen Typ I, Kollagen Typ III oder Fibrinogen für eine Stunde bei 37°C beschichtet (**Beschichtungstyp I.**), an das Perfusion Set angeschlossen (**Abschnitt 2.2.2.4.5**) und bei 10 mbar bis 80 mbar (schrittweise Erhöhung um 10 mbar) unter Fluss gesetzt (**Anhang Tabelle 2**). Um VWF-Fäden sichtbar zu machen wurden Latex-GPIIb $\alpha$ -Beads hinzugegeben.

An den mit Kollagen Typ I und Fibrinogen beschichteten Sticky-Slides hat kein wtVWF gebunden und daher auch keine VWF-Fäden gebildet. Die Erhöhung des Scherflusses hat keine Veränderung ergeben.

Im Gefäßsystem sind Blutkörperchen größer als Thrombozyten vorhanden, wodurch die Blutkörperchen die Thrombozyten an die Gefäßwand drücken. Deshalb wurden Sephacryl Beads verwendet, die sehr groß sind (50  $\mu\text{m}$ ) und den VWF und die Latex Beads nach unten drücken sollten. Diese wurden in das Reservoir des Perfusion Sets hinzugeben. Das mit Kollagen Typ III beschichtete Sticky-Slide wurde bei 10 mbar bis 80 mbar (schrittweise Erhöhung um 10 mbar) unter Fluss gesetzt (**Anhang Tabelle 2**).

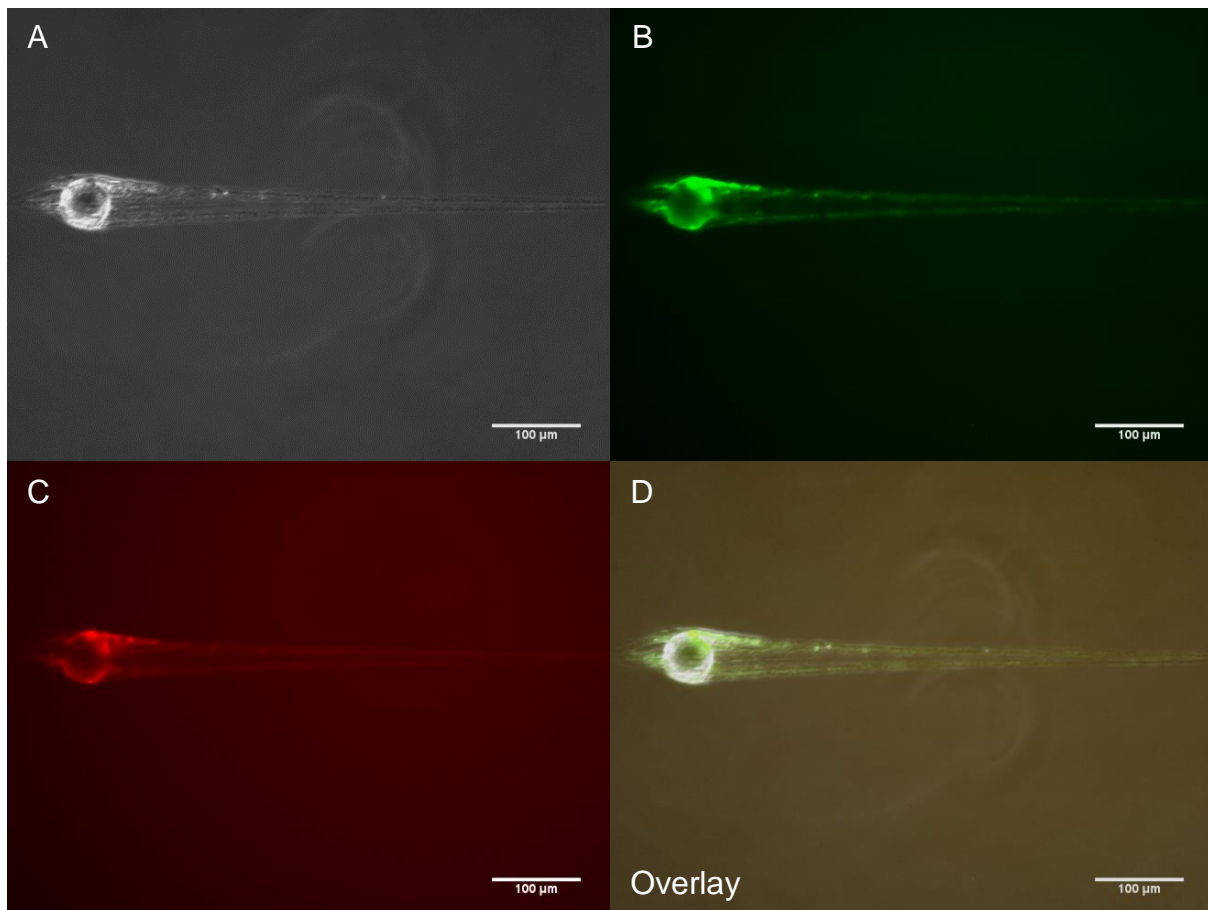
Der Einsatz der Sephacryl Beads hat keine VWF-Fadenbildung hervorgerufen. Die Beads sind während des Flussversuches beschädigt worden, haben sich am Kanalrand angesammelt und eine Schicht gebildet (**Abbildung 6**).



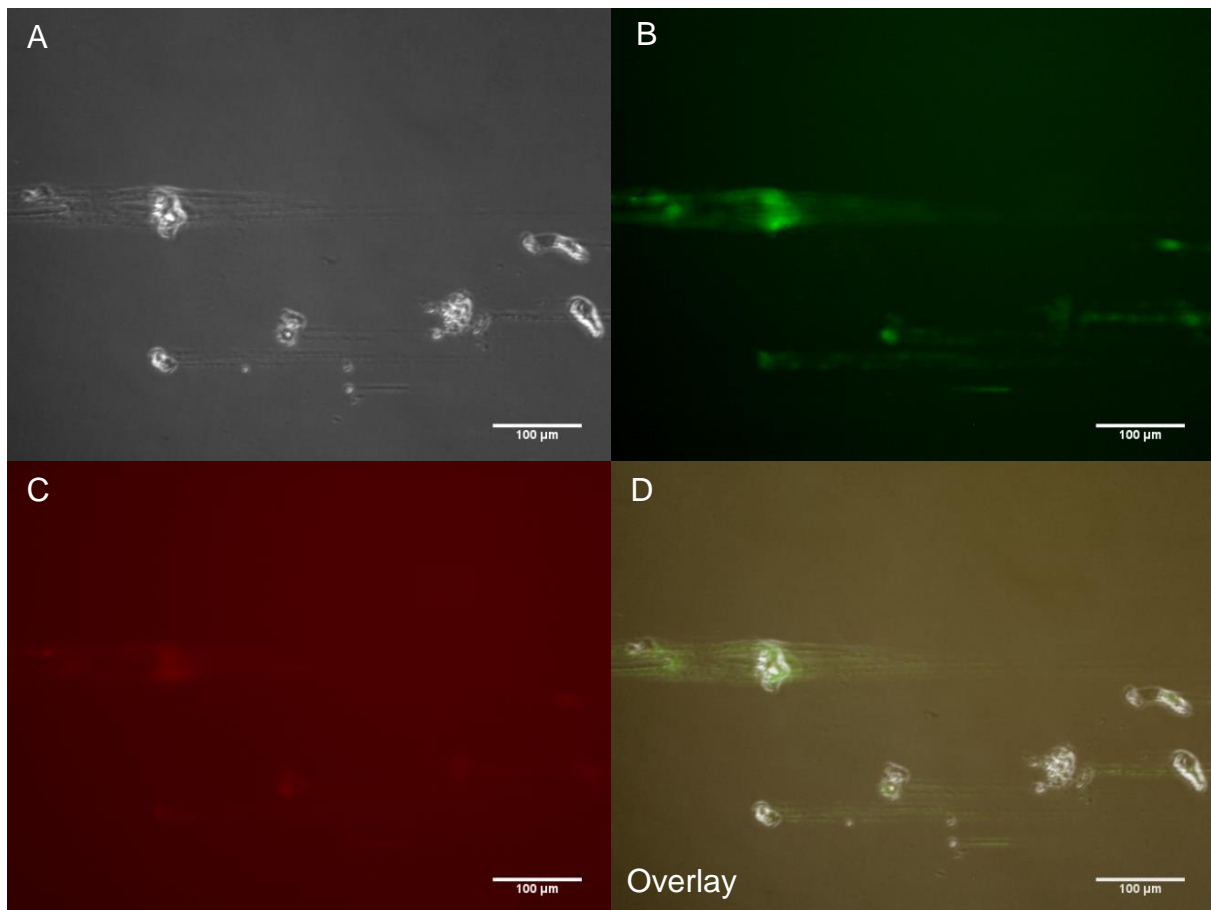
**Abbildung 6: Sephacryl Beads nach einem Flussversuch mit Kollagen Typ III beschichtetem Slide und darüber fließendem wtVWF.** Nach der Beschichtung des Kanal-Slides mit Kollagen Typ III, wurden im anschließenden Flussversuch rekombinanter wtVWF und Sephacryl Beads herübergeströmt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence) im Durchlichtkanal. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Um den Blutfluss besser simulieren zu können, wurde die Viskosität bei einem weiteren Versuch mit Glycerin auf 4,5 mPa·s erhöht. Des Weiteren wurde die Sephacryl Bead Menge um die Hälfte reduziert und das Sticky-Slide mit Kollagen Typ III über Nacht bei RT beschichtet (**Beschichtungstyp I.**). Das beschichtete Sticky-Slide wurde bei 10 mbar bis 80 mbar (Schrittweise Erhöhung um 10 mbar) unter Fluss gesetzt (**Anhang Tabelle 2**).

Bereits bei einer geringen Flussrate (10 mbar) haben sich VWF-Fäden überwiegend am Rand, an den angelagerten Sephacryl Beads gebildet. Diese wurden zusätzlich zu den GPIIb $\alpha$ -Beads mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht, indem VWF mithilfe eines anti-VWF Antikörpers und eines grün-fluoreszierenden Sekundärantikörpers detektiert wurde. Da die GPIIb $\alpha$ -Beads mit einem anti-GPIIb $\alpha$  Antikörper aus der Maus gekoppelt sind, konnten sie direkt über einen rot-fluoreszierenden anti-mouse Sekundärantikörper gefärbt werden (**Abbildung 7**). Die Sephacryl Beads sind nicht, wie im vorherigen Versuch, zerstört worden. Außerdem haben sich in der Mitte des Kanal-Slides VWF-Fäden an Verunreinigungen gebildet (**Abbildung 8**).



**Abbildung 7: Immunfluoreszenz-markierte wtVWF-Fäden auf der Oberfläche von Sephacryl Beads.** Ein Kollagen Typ III (Endkonzentration 200 µg/mL) beschichtetes Kanal-Slide wurde mit 10 µg/mL rekombinantem wtVWF und Sephacryl Beads bei einer Viskosität von 4,5 mPa·s (eingestellt mit Glycerin) überströmt (**A**). Währenddessen wurden wtVWF und GPIIb $\alpha$ -Latexbeads mittels Immunfluoreszenz detektiert. In die Reservoirs des Perfusion Sets wurden ein primärer Antikörper (rabbit anti-human VWF Antikörper) und zwei Sekundärantikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 und goat anti-mouse Alexa Fluor 546) pipettiert und anschließend mithilfe des GFP-Filters (wtVWF grün) (**B**) und des TRITC-Filters (Latexbeads rot) (**C**) detektiert. Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht 100 µm. (**D**) zeigt die Überlagerung von (**A**), (**B**) und (**C**).

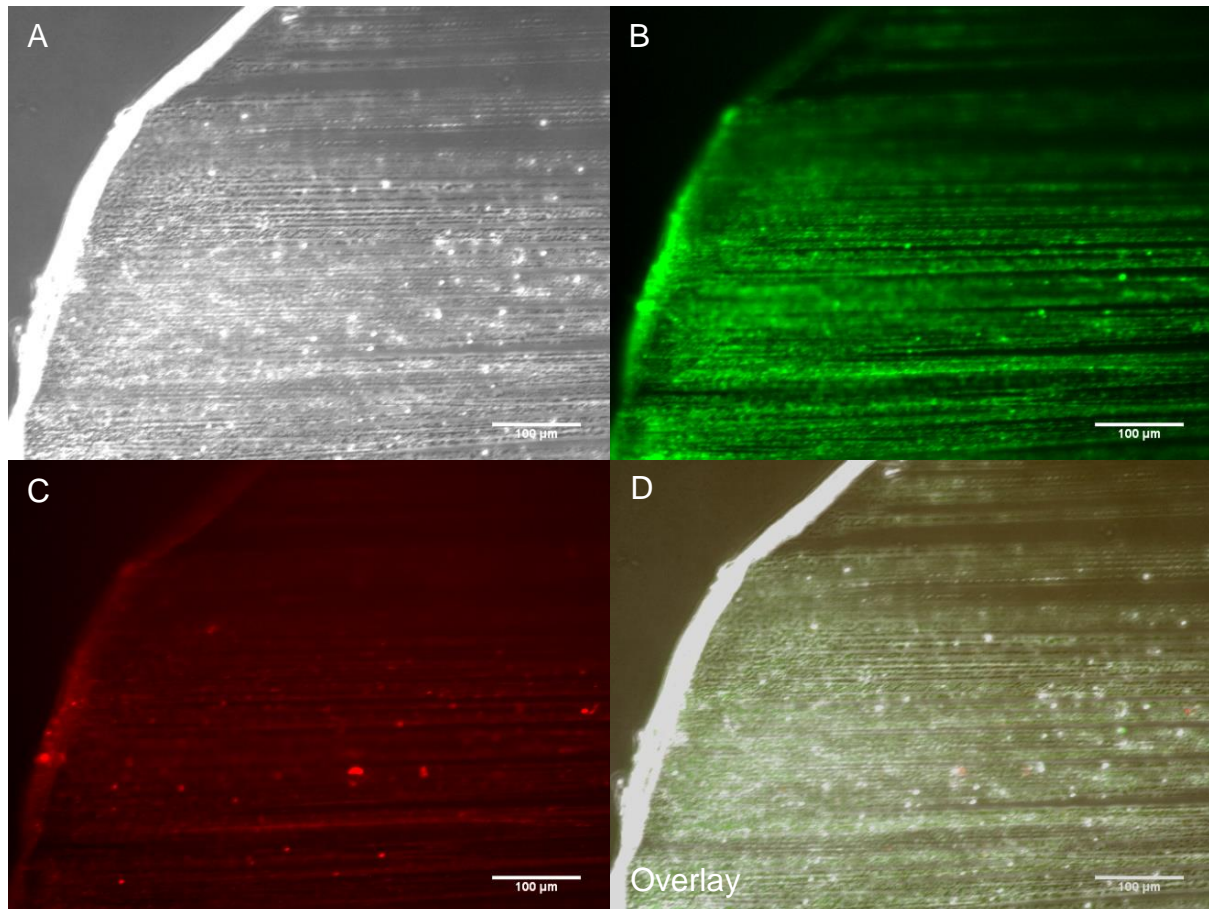


**Abbildung 8: Durch Immunfluoreszenz markierte wtVWF-Fäden gebunden an Verunreinigungen.** Nach der Beschichtung des Kanal-Slides mit Kollagen Typ III (Endkonzentration 200 µg/mL), wurde es im anschließenden Flussversuch mit 10 µg/mL rekombinantem wtVWF und Sephacryl Beads bei einer Viskosität von 4,5 mPa·s (eingestellt mit Glycerin) überströmt (**A**) Währenddessen wurden wtVWF und GPIIb $\alpha$ -Latexbeads mittels Immunfluoreszenz detektiert. In die Reservoirs des Perfusion Sets wurden ein primärer Antikörper (rabbit anti-human VWF Antikörper) und zwei Sekundärantikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 und goat anti-mouse Alexa Fluor 546) pipettiert und anschließend mithilfe des GFP-Filters (wtVWF grün) (**B**) und des TRITC-Filters (Latexbeads rot) (**C**) detektiert. Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht 100 µm. (**D**) zeigt die Überlagerung von (**A**), (**B**) und (**C**).

Da mehrere Veränderungen gleichzeitig nach dem vorherigen Versuch vorgenommen wurden, sind bei einem weiteren Durchlauf diese Veränderungen schrittweise wiederholt worden, um die genaue Ursache der Fadenbildung feststellen zu können. Daher wurde mit Kollagen Typ III ebenfalls über Nacht bei RT beschichtet (**Beschichtungstyp I.**) und der Versuch bei gleichen Flusseinstellungen (10 mbar bis 80 mbar mit schrittweiser Steigerung um 10 mbar) durchgeführt.

Dabei hat sich gezeigt, dass sich nur wenige Fäden an Verunreinigungen gebildet haben. Anschließend wurde die Viskosität mit Glycerin zunächst auf 1,65 mPa·s eingestellt. Dies hat jedoch keine weitere Fadenbildung hervorgerufen. Daher wurde die Viskosität auf 4,5 mPa·s erhöht, was jedoch zu keiner Veränderung führte. WtVWF-

Fäden haben sich lediglich an einer Verunreinigung gebildet (**Abbildung 9**). Aufgrund dessen wurden keine Sephacryl Beads mehr verwendet.



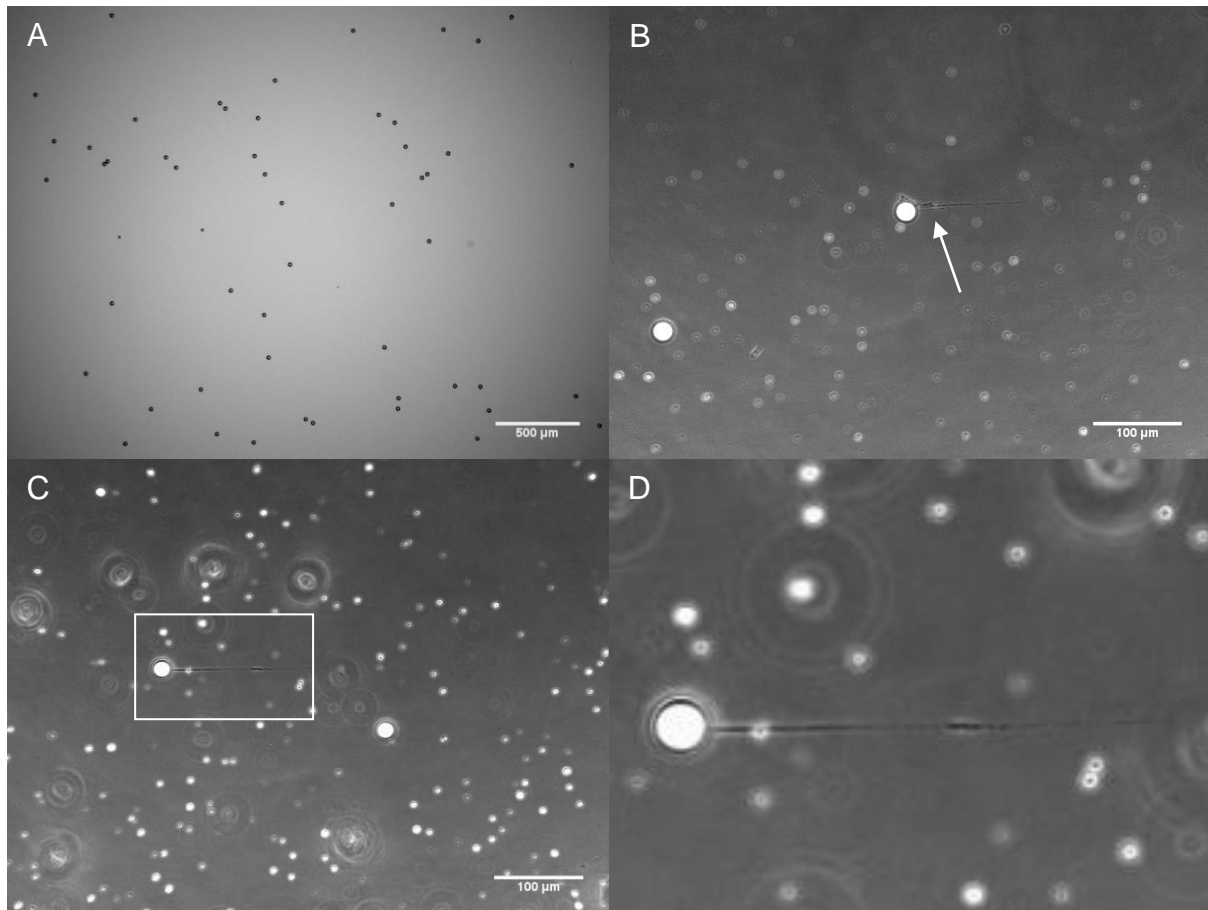
**Abbildung 9: Durch Immunfluoreszenz markierte wtVWF-Fäden gebunden an Verunreinigungen.** Nach der Beschichtung des Kanal-Slides mit Kollagen Typ III (Endkonzentration 200 µg/mL), wurde es im anschließenden Flussversuch mit 10 µg/mL rekombinatem wtVWF und Sephacryl Beads bei einer Viskosität von 4,5 mPa·s (eingestellt mit Glycerin) überströmt (**A**). Währenddessen wurden wtVWF und GPIIb/IIIa-Latexbeads mittels Immunfluoreszenz detektiert. In die Reservoirs des Perfusion Sets wurden ein primärer Antikörper (rabbit anti-human VWF Antikörper) und zwei Sekundärantikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 und goat anti-mouse Alexa Fluor 546) pipettiert und anschließend mithilfe des GFP-Filters (wtVWF grün) (**B**) und des TRITC-Filters (Latexbeads rot) (**C**) detektiert. Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht 100 µm. (**D**) zeigt die Überlagerung von (**A**), (**B**) und (**C**).

Da sich wtVWF-Fäden an einer Verunreinigung gebildet haben, wurden in den weiteren Versuchen Polystyrene Beads verwendet, um einen Ankerpunkt für den VWF bereitzustellen. Diese sind in unterschiedlichen Größen erhältlich und können durch ionische Wechselwirkungen Proteine auf ihrer Oberfläche binden. Zunächst wurden Polystyrene Beads mit einer Größe von 25 µm verwendet und auf einem Sticky-Slide gebunden. Zuerst wurde überprüft, bei welcher Bead-Konzentration die Verteilung der Beads auf dem Slide am sinnvollsten erscheint. Dabei ist wichtig, dass die Beads einen ausreichend großen Abstand voneinander aufweisen, damit sich die ausgebil-

deten VWF-Fäden nicht berühren können. Des Weiteren wurde überprüft, wie die Beads am Slide gebunden werden können, ohne unter Fluss abzureißen.

Eine Suspension mit 1.000 Polystyrene Beads (25  $\mu\text{m}$ ) in 100  $\mu\text{l}$  Ethanol (**Beschichtungstyp III.**) wies keine gute Verteilung der Beads auf einem Sticky-Slide auf. Das Ethanol ist ungleichmäßig verdampft, wodurch die Beads an den Kanalrand gedrückt worden sind. Jedoch war eine Region mit einer guten Verteilung vorhanden (**Abbildung 10 (A)**), weshalb ein Flussversuch bei 10 mbar durchgeführt worden ist.

Bereits nach 15 Minuten unter Fluss haben sich wtVWF-Fäden an den Beads gebildet (**Abbildung 10 (B-D)**). Da die Fäden bei 10 mbar leicht mechanisch abrissen, wurde der Druck auf 5 mbar heruntergeregelt. Bei gleicher Vorgehensweise wurden Beads mit einer Größe von 90  $\mu\text{m}$  verwendet. Dies hat jedoch zu keinen anderen Ergebnissen, als bei dem Versuch mit den kleineren Beads geführt. VWF-Fäden binden an Verunreinigungen sowie an den Beads gleichermaßen. Mehr Beads mit einer besseren Verteilung wären eventuell von Vorteil, da für ein diagnostiktaugliches Assay mehr Fäden benötigt werden, die dann von ADAMTS13 geschnitten werden können.



**Abbildung 10: WtVWF kann unter Fluss an Polystyrene Beads binden.** Nach der Beschichtung eines Kanal-Slides mit Polystyrene Beads (25 µm) (1.000 Beads/100 µL) (A) wurden diese im anschließenden Flussversuch mit 10 µg/mL rekombinatem wtVWF überströmt. Es haben sich wtVWF-Fäden an einigen Beads gebildet (B) und (C). Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht bei (A) 500 µm und bei (B) und (C) 100 µm. (D) zeigt den in (C) markierten Ausschnitt vergrößert.

Für einen weiteren Flussversuch wurden 2.500 Beads (25 µm)/100 µL auf einem Sticky-Slide verwendet (**Beschichtungstyp II.**). Nach Starten des Flusses bei 5 mbar haben sich innerhalb von 10 Minuten einige VWF-Fäden an den Beads, aber auch an Verunreinigungen gebildet, die jedoch leicht mechanisch abrissen. Nach 12 Minuten unter Flussbedingungen wurde schrittweise die Viskosität von 2 mPa·s auf 6 mPa·s in 1 mPa·s Schritten mit Methylcellulose erhöht. Diese erhöht die Viskosität eines Fluids, ohne eine zellschädigende Wirkung zu haben, was von Vorteil sein könnte, wenn später Zellen in dem Assay eingesetzt werden sollten. Die Erhöhung der Viskosität hat jedoch keine weitere Fadenbildung hervorgerufen.

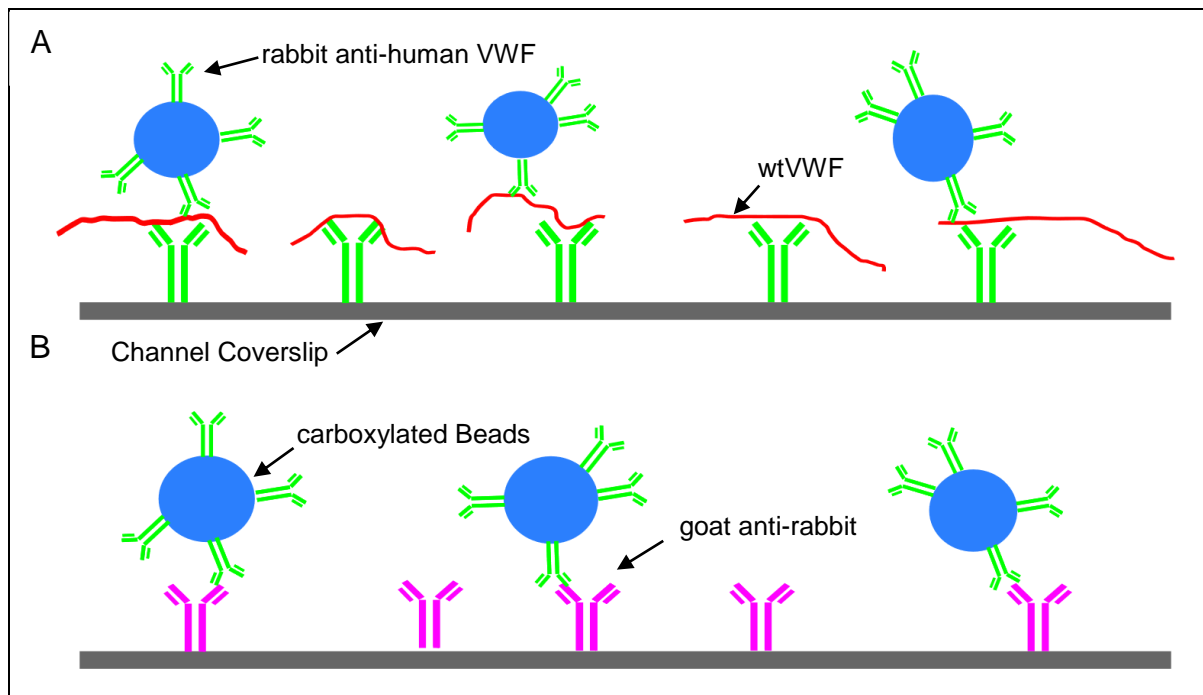
In den weiteren Versuchen wurden carboxylierte Beads verwendet, die auf ihrer Oberfläche eine Carboxyl-Gruppe tragen, über die sie mit verschiedenen Proteinen funktionalisiert werden können (**Abschnitt 2.2.2.4.1**).



Die Kanal-Slides wurden mit den an Protein gebundenen Beads auf unterschiedliche Weise beschichtet. In **Abbildung 11** sind die beiden Beschichtungsvarianten schematisch dargestellt. Zunächst wurde überprüft, ob die Antikörperbindung (rabbit anti-human VWF) an die carboxylierten Beads (in der Folge anti-VWF-Beads genannt) funktioniert hat. Dafür wurde eine Nachweisreaktion mittels einer Meerrettichperoxidase-Farbreaktion in einem Kanal-Slide sowie in einem Reaktionsgefäß durchgeführt (**Abschnitt 2.2.2.4.4**). Beide Nachweisreaktionen haben einen blauen Farbumschlag ergeben, womit der Beweis geliefert wurde, dass die Kopplung stattgefunden hat.

Bei der ersten Variante wurden anti-VWF-Beads über immunoadsorbierten VWF an die Oberfläche des Kanal-Slides gekoppelt (**Beschichtungstyp V.**) (**Abbildung 11(A)**). Die Verteilung der Beads auf dem Kanal-Slide war sehr gleichmäßig, jedoch haben die anti-VWF-Beads nicht an den wtVWF gebunden und konnten mit 3 mL DPBS herausgewaschen werden. Es wurden erneut anti-VWF-Beads in das Kanal-Slide pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Trotz der längeren Inkubationszeit (über Nacht statt eine Stunde) konnten die Beads herausgespült werden.

In der zweiten Variante (**Abbildung 11 (B)**) wurde zuerst ein goat anti-rabbit AK am Kanal-Slide gebunden und anschließend mit anti-VWF-Beads inkubiert (**Beschichtungstyp VI.**). Hierbei haben nur sehr wenige anti-VWF-Beads am Kanal-Slide gebunden, weshalb diese größtenteils mit DPBS herauswaschen werden konnten.

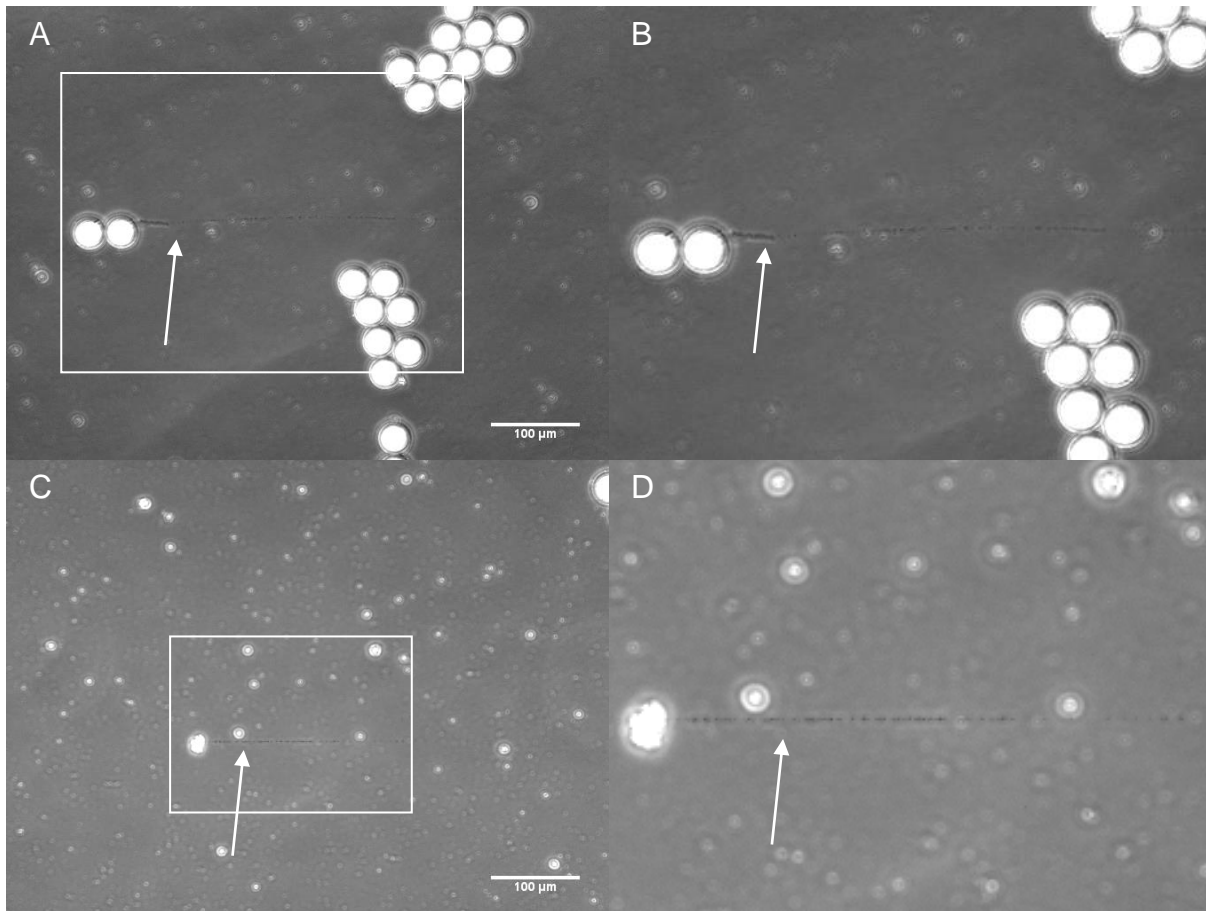


**Abbildung 11: Schematische Darstellung von verschiedenen Beschichtungen des Kanal-Slides.** Bei **(A)** wird ein Kanal-Slide zunächst mit rabbit anti-human VWF Antikörper (1:1.000) beschichtet, eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend gewaschen und mit 10 µg/mL rekombinanten wtVWF beschichtet und bei 37°C inkubiert. Danach werden carboxylierte Beads zugegeben an die ein rabbit anti-human VWF Antikörper gekoppelt ist. Bei **(B)** wird ein Kanal-Slide zunächst mit goat anti-rabbit AK (1:1.000) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird das Slide mit anti-VWF-Beads (1:6) beschichtet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Des Weiteren wurden anti-VWF-Beads (1:6 Verdünnung) auf einem Sticky-Slide angeschmolzen (**Beschichtungstyp IV.**) und der Flussversuch bei 5 mbar durchgeführt. Jedoch haben sich keine VWF-Fäden an Beads und auch nicht an Verunreinigungen gebildet. Um zu überprüfen, ob sich zunächst VWF an den Beads anlagern muss, um anschließend weitere VWF-Multimere zu binden und um Fäden zu bilden, wurde der Fluss für 12 Minuten abgeschaltet. Allerdings haben sich nach dem Anschalten des Flusses keine Fäden gebildet. Weiterhin wurde der Druck auf 10 mbar erhöht. Nun konnten sich Fäden bilden, die jedoch mechanisch abrissen. Infolge dessen wurde der Druck auf 7 mbar herunterreguliert. Es haben sich mit der Zeit keine weiteren VWF-Fäden gebildet.

Bei einem weiteren Sticky-Slide wurde die Kopplung von anti-VWF Antikörper an carboxylierte Beads direkt im Slide durchgeführt (**Beschichtungstyp VII.**). Trotz keiner guten Verteilung der Beads auf dem Kanalboden wurde der Flussversuch bei 7 mbar durchgeführt. Nach 14 Minuten unter Fluss haben sich die ersten VWF-Fäden an einigen Beads, aber auch an Verunreinigungen, gebildet (**Abbildung 12**). Dabei waren die Beads an der Decke sowie am Boden des Kanal-Slides lokalisiert. Die Fä-

den rissen auch hier bei einer geringen Scherrate mechanisch ab. Des Weiteren waren viele Hintergrundpartikel zu erkennen, die kleiner sind, als die Beads.

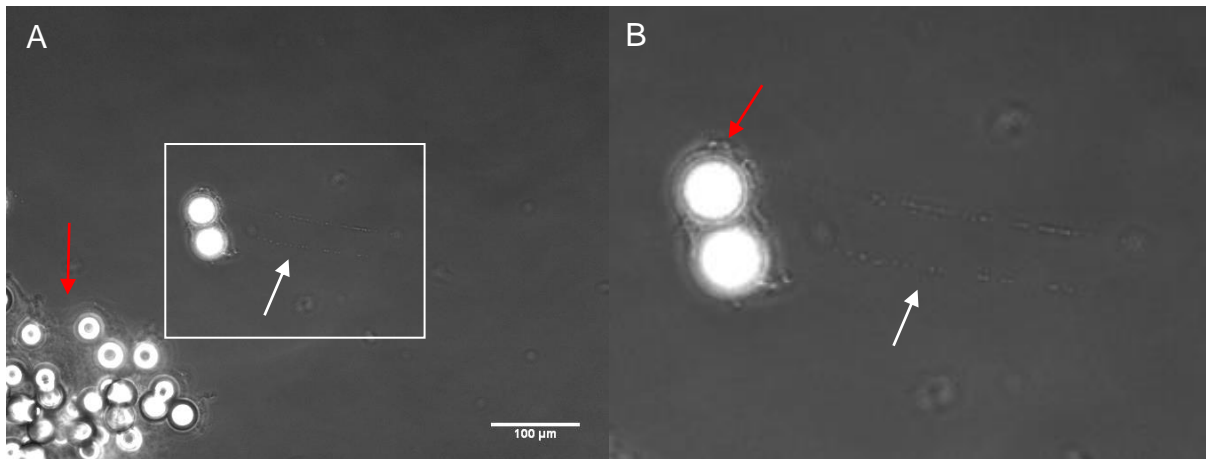


**Abbildung 12: VWF-Fäden an mit anti-VWF Antikörper gekoppelten carboxylierten Beads.** Nach der Kopplung von rabbit anti-human VWF Antikörpern an carboxylierte Beads im Kanal-Slide, wurden diese im anschließenden Flussversuch mit 10 µg/mL rekombinatem wtVWF überströmt. Es haben sich wtVWF-Fäden an einigen Beads (**A**), sowie einigen Verunreinigungen (**C**) gebildet. Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht 100 µm. (**B**) zeigt den in (**A**) markierten Ausschnitt vergrößert. (**D**) zeigt den in (**C**) markierten Ausschnitt vergrößert.

Bei einem weiteren Versuch wurden ein µ-Sticky-Slide<sup>0,2</sup> Luer und ein µ-Slide<sup>0,4</sup> Luer mit Kollagen-Beads beschichtet (**Beschichtungstyp VIII.**). Es wurde verglichen, auf welchem Slide die Beads besser haften und sich stabilere VWF-Fäden bilden können. Die gekoppelten Beads klebten im Reaktionsgefäß aneinander, weshalb die Verteilung der Beads auf den Slides ungleichmäßig war. Die Aufnahme mit einem Fluoreszenzmikroskop zeigt Kollagen, welches an den Beads haftet (**Abbildung 13**, rote Pfeile). Nach Spülen des Slides mit 3 mL DPBS blieben die Beads haften.

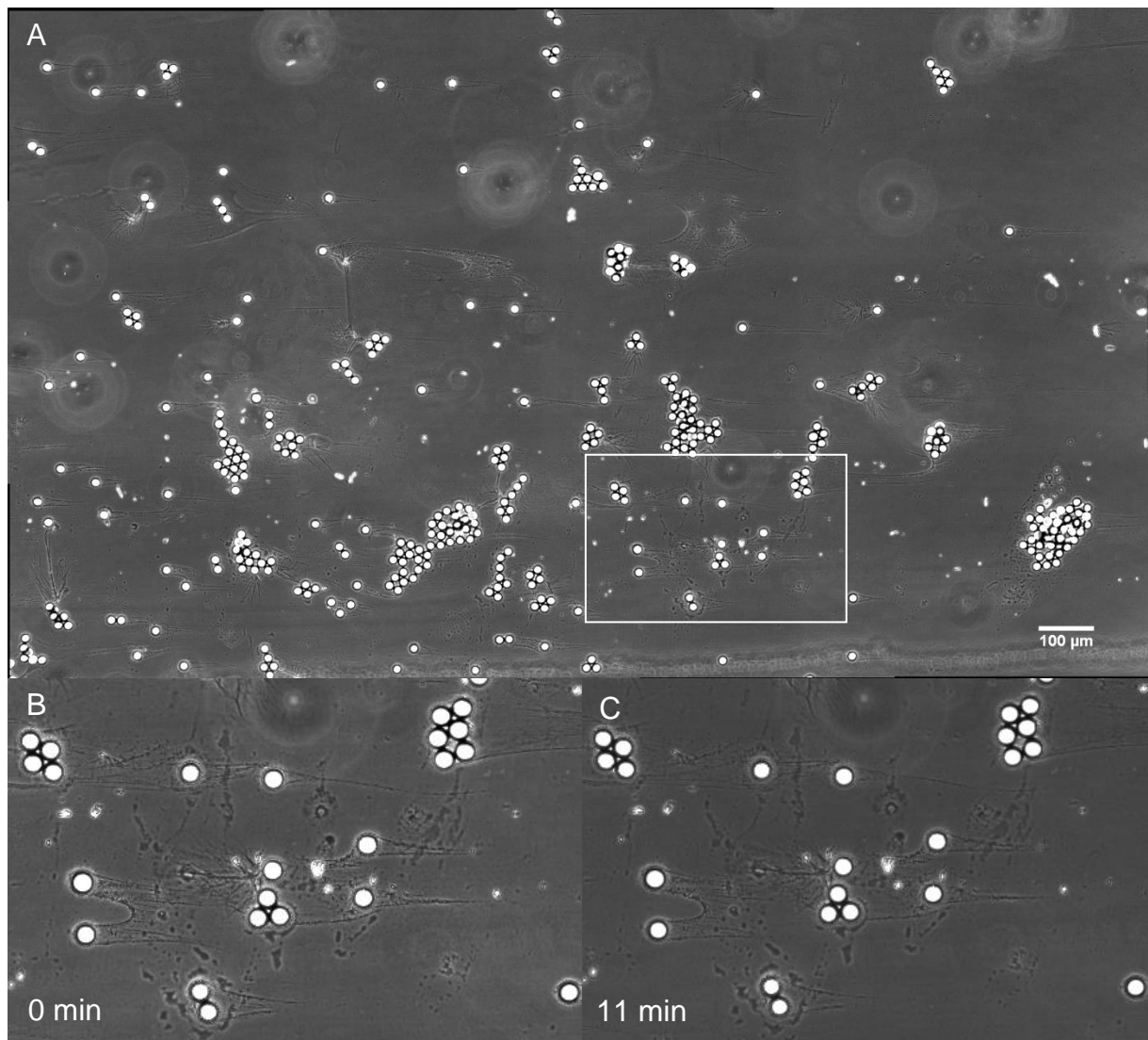
Zuerst wurde das µ-Slide<sup>0,4</sup> Luer an die fluidische Einheit angeschlossen und der Flussversuch bei 7 mbar durchgeführt. Die Beads wurden durch den Fluss nicht weggespült, weshalb der Druck auf 15 mbar erhöht wurde, damit wtVWF mehr Scherstress ausgesetzt ist und damit leichter gestreckt werden kann. Innerhalb von

9 Minuten unter Fluss haben sich die ersten Fäden an den Beads gebildet (**Abbildung 13**, weiße Pfeile). Während der schrittweisen Erhöhung des Druckes auf 30 mbar sind die Fäden mechanisch abgerissen und es haben sich keine neuen ausgebildet. Das gleiche Ergebnis war bei dem  $\mu$ -Sticky-Slide<sup>0,2</sup> Luer zu beobachten.



**Abbildung 13: VWF-Fäden an Kollagen Typ I gekoppelten carboxylierten Beads.** Nach der Beschichtung des Kanal-Slides mit Kollagen Typ I gekoppelten carboxylierten Beads wurden diese im anschließenden Flussversuch mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rekombinantem wtVWF überströmt. Es haben sich wtVWF-Fäden an einigen Beads gebildet (**A**). Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht bei 100  $\mu\text{m}$ . (**B**) zeigt den in (**A**) markierten Ausschnitt vergrößert.

Bei einem weiteren Versuch wurde die Kopplung von Kollagen Typ I an carboxylierte Beads im Sticky-Slide durchgeführt, die vorher auf einem Coverslip angeschmolzen wurden (**Beschichtungstyp VII.**). Die Verteilung der Beads im Slide war gleichmäßiger als beim vorherigen Versuch. Der Flussversuch wurde bei 7 mbar Druck durchgeführt. Die Beads blieben trotz des Flusses im Kanal haften. Innerhalb einer Minute haben sich erste wtVWF Fäden nur an den Beads gebildet (**Abbildung 14**). Weiterhin scheint eine Quervernetzung der Fäden stattgefunden zu haben. Aufgrund der guten Fadenbildung und der gleichmäßigen Verteilung der Beads wurde überprüft, ob die Fäden geschnitten werden können. Dazu wurde ADAMTS13 (1.000 ng/mL) in das Reservoir des Perfusion Sets hinzugegeben (**Abschnitt 2.2.2.4.5**). Nach 11 Minuten (**Abbildung 14 (C)**) erkennt man, dass keine Proteolyse der Fäden stattgefunden hat. Daher wurde nochmal ADAMTS13 in einer höheren Konzentration (10.000 ng/ml) hinzugegeben. Auch hierbei wurden die wtVWF-Fäden nicht geschnitten, obwohl sich die Fäden bewegen und nicht fest am Kanal-Slide gebunden waren. Weiterhin wurde überprüft, ob die wtVWF-Fäden bei höheren Scherraten mechanisch abreißen. Dabei wurde der Druck von 14 mbar auf 40 mbar erhöht, was die Fäden nicht zerstört hat.



**Abbildung 14: Proteolyse von wtVWF-Fäden an Kollagen Typ I gekoppelten carboxylierten Beads.** Nach der Kopplung von Kollagen Typ I an carboxylierte Beads im Kanal-Slide, wurde es im anschließenden Flussversuch mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rekombinatem wtVWF überströmt. Es haben sich wtVWF-Fäden an den Beads gebildet (A). Anschließend wurde ADAMTS13 (1.000 ng/ml) hinzugegeben und für 11 Minuten jede Minute ein Bild aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence), der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . (B) zeigt den in (A) markierten Ausschnitt vor der Zugabe von wtADAMTS13 und (C) zeigt den in (A) markierten Ausschnitt 11 Minuten nach Zugabe der wtADAMTS13.

### 3.2. Proteolyse von VWF-Varianten im LTA

Es sollte ein Assay etabliert werden, dass die Proteolyse von VWF-Thrombozyten-Aggregaten in der Blutzirkulation simuliert. Dafür wurde überprüft, ob die VWF-Thrombozyten-Komplexbildung sowie die anschließende Proteolyse durch wtADAMTS13 mit einem LTA gemessen werden kann. Im Falle einer Verletzung führt erhöhter Scherfluss zur Aktivierung der Bindung von Thrombozyten an die A1-Domäne von VWF. Durch anschließende Öffnung der VWF A2-Domäne kommt es zur Aktivierung der Proteolyseschnittstelle für ADAMTS13. Im LTA wird der Scherfluss in einer

Glasküvette durch ein Rührstäbchen und einen, im Gerät eingebauten, Magnetrührer erzeugt. Einzelne Thrombozyten erzeugen eine größere Trübung (Turbidität) der Lösung als Komplexe, weshalb die Turbidität bei Komplexbildung sinkt. Auf diese Weise kann die Bildung und das Auflösen von Komplexen über die Turbidität verfolgt werden.

Für die Etablierung eines zellfreien Assays wurde zunächst getestet, ob GPIIb/IIIa-Latexbeads verwendet werden können, um die Funktion der Thrombozyten zu simulieren. Für die Messung der Komplexbildung mit dem LTA wurden zunächst 100 µL GPIIb/IIIa-Latexbeads und wtVWF (Endkonzentration 100% = 10 µg/mL) in einer Glasküvette mit Rührstäbchen zusammengeführt. Nach Starten der Messung der Turbidität wurde die Basislinie festgesetzt. Für die Aktivierung des wtVWF zur Ausbildung der Komplexe reicht der Scherfluss im LTA nicht aus, daher wurde Ristocetin (Endkonzentration 0,6 mg/mL) hinzugegeben. Dieses ist ein Antibiotikum, welches die VWF A1-Domäne aktiviert und damit die Bindung der Thrombozyten, bzw. bei diesem Versuchsaufbau, die Bindung der GPIIb/IIIa-Latexbeads, ermöglicht. Durch die Ausbildung der Komplexe sollte die Turbidität abnehmen. Jedoch ist diese nicht gesunken, weshalb nochmals 100 µL GPIIb/IIIa-Latexbeads hinzugegeben wurden. Nach weiteren 15 Minuten zeigte sich weiterhin keine Veränderung. Daher wurden im weiteren Verlauf der Entwicklung des Assays Thrombozyten statt GPIIb/IIIa-Latexbeads verwendet.

Diese werden vor jedem Versuch aus Buffy Coats isoliert und durch mehrfaches Waschen von restlichen Plasmaproteinen, zu denen auch VWF gehört, getrennt. Zunächst wurde vor jedem Versuch getestet, ob die isolierten Plättchen nicht voraktiviert wurden. Eine solche Voraktivierung könnte zu echter, irreversibler Aggregation führen. Die dabei entstehenden Aggregate könnten durch ADAMTS13 nicht mehr aufgelöst werden. Wenn die isolierten Plättchen aus dem Buffy Coat keine Aktivität aufweisen, können die Messungen gestartet werden. Dabei sind zwei Messungen parallel möglich und der Plättchenresuspensionpuffer dient als Referenzwert.

In drei unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Buffy Coats (Plättchen von verschiedenen Spendern) wurden neun unterschiedliche VWF-Varianten sowie wtVWF untersucht.

Damit sich Plättchen-VWF-Komplexe bilden können, wird bei wtVWF sowie bei den VWF-Varianten **p.Pro1266Leu**, **p.Arg1341Gln** und **p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser**

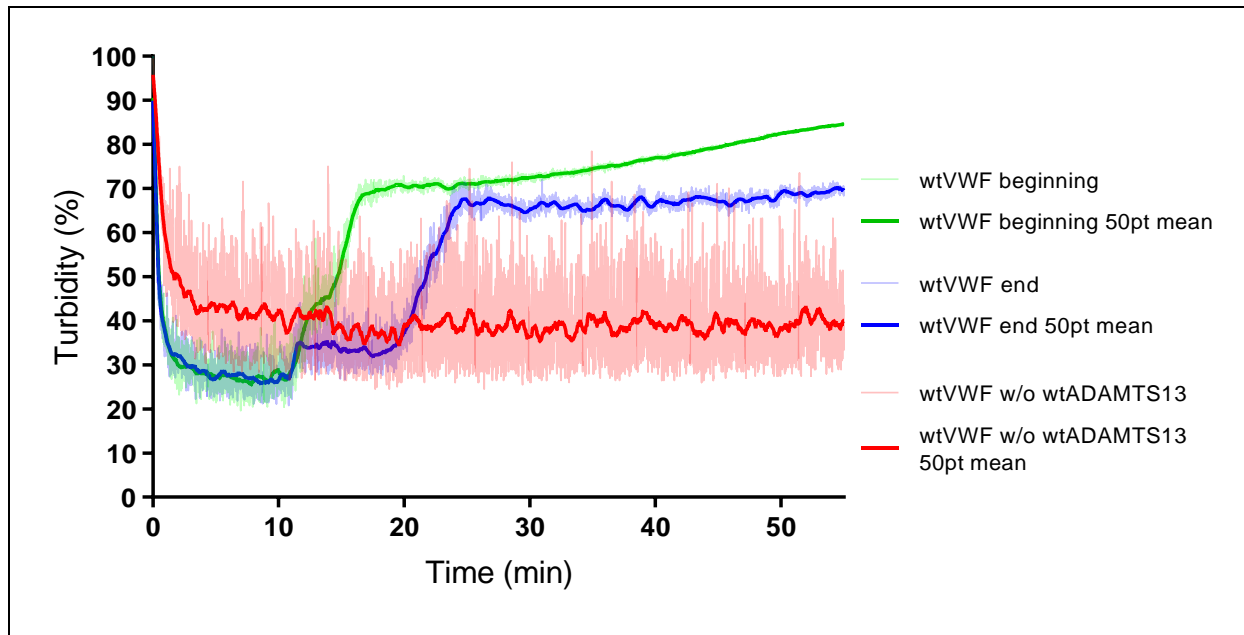
Ristocetin (Endkonzentration 0,6 mg/mL) benötigt. Die VWF-Varianten **p.Arg1308Cys**, **p.Ala1461Asp**, **p.Val1316Met**, **p.Ile1309Val**, **p.MetDup1304** und **p.Arg1306Trp** aggregieren hingegen bereits ohne Zugabe von Ristocetin. Dieses zeigt die für VWS 2B typische gain-of-function, die durch die Mutation hervorgerufen wird.

Um die Kurven besser darstellen zu können, wurden diese geglättet indem der Mittelwert der Originalwerte über 50 Messwerte berechnet wurde. Durch die resultierende Kurve wurde anschließend ein Polynom 6. Ordnung gelegt.

WtADAMTS13 schneidet unter Scherfluss die A2-Domäne des VWF, wodurch die Komplexe kleiner werden und damit die Trübung steigen sollte. Als Negativkontrolle diente ein Versuch ohne die Zugabe von wtADAMTS13 (rote Kurve, **Abbildung 15**). Dabei lösten sich die wtVWF-Thrombozyten-Komplexe innerhalb einer Stunde nicht auf, was sich durch die konstant niedrige Trübung über die Zeit zeigt.

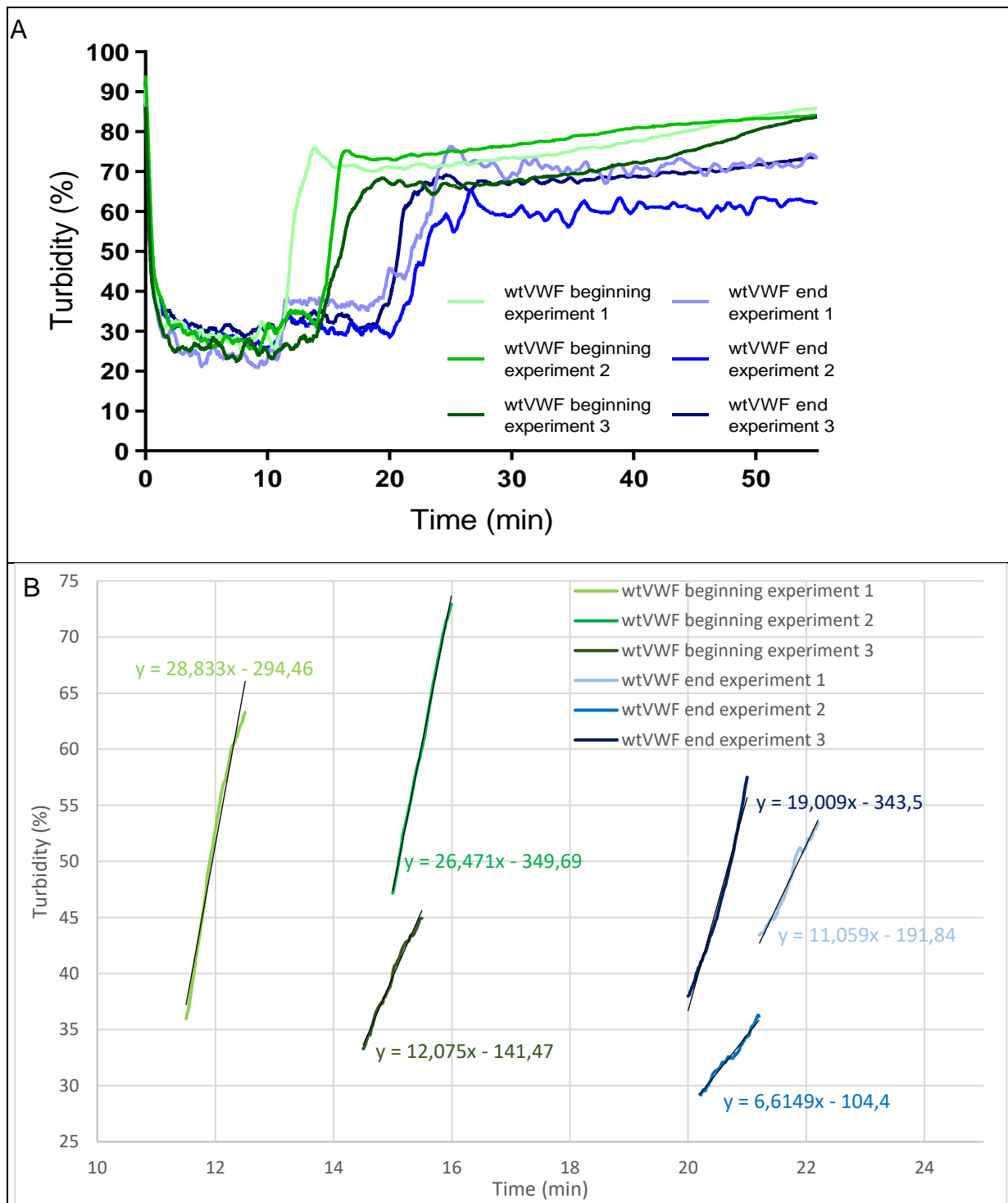
Da die Plättchen nur eine begrenzte Haltbarkeit besitzen, wurde der Versuch mit wtVWF zu Beginn und am Ende eines Versuchstages durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die Kurvenverläufe mit dem Alter der Plättchen verändern (**Abbildung 15**). Der zu Beginn gemessene Abbau der Komplexe startete direkt nach Zugabe von wtADAMTS13 (Endkonzentration 1.000 ng/mL), was am Anstieg der Turbidität zu erkennen ist. Die am Ende des Versuchstages gemessene Proteolyse erfolgte ebenfalls gleich zu Beginn der ersten Minute, stagnierte anschließend für fünf Minuten und stieg danach wieder an (**Abbildung 15**).

Für den genauen Vergleich der wtVWF Graphen wird die Proteolysegeschwindigkeit mit Hilfe der Steigung zwischen zwei Punkten ermittelt. Dafür wird die Steigung der Einzelgraphen im steilsten Bereich der Kurve für eine Minute bestimmt (**Abbildung 16**). Anschließend wird der Mittelwert der Steigungen für die Dreifachbestimmung ermittelt (**Abbildung 20**). Für den zu Beginn des Versuchstages gemessenen wtVWF ergab sich eine mittlere Steigung von 22,5 %/min, am Ende des Versuchstages betrug die Steigung 12,2 %/min (**Abbildung 20**). Deshalb wurden die VWF-Varianten an den Versuchstagen in der gleichen Reihenfolge gemessen, um zu prüfen, ob es einen systematischen Fehler durch den Zeitpunkt der Messung nach Plättchenisolierung gibt.

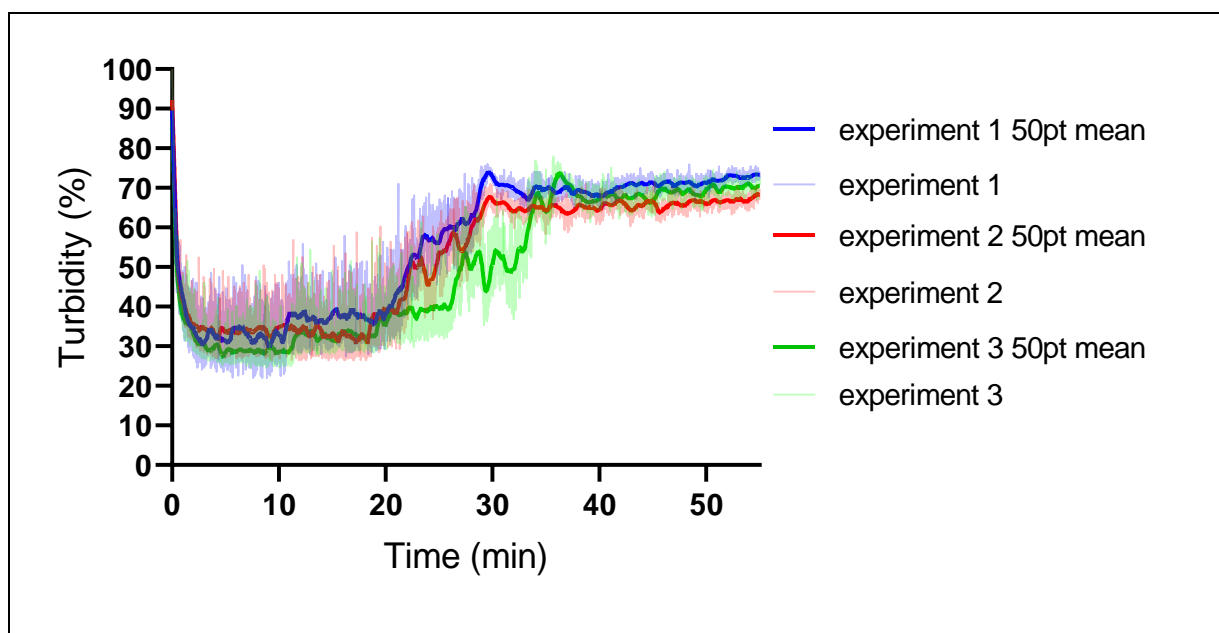


**Abbildung 15: Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von wtVWF-Thrombozyten-Komplexen zu Beginn und am Ende eines Versuchstages.** An drei Versuchstagen (jeweils zu Beginn und Ende) wurde die Komplexbildung von wtVWF und Thrombozyten mit einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer gemessen. In einer Glasküvette wurden wtVWF (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), Thrombozyten ( $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) und Ristocetin (0,6 mg/mL) im Plättchenresuspensionspuffer vermengt. Nach 12 Minuten wurde zur Proteolyse der Komplexe wtADAMTS13 (1.000 ng/mL) hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Durchlauf ohne die Zugabe von wtADAMTS13 durchgeführt (rot). Der Graph zeigt den gemittelten Kurvenverlauf der Turbidität in % über 55 Minuten aus allen drei Versuchen am Anfang (grün) und am Ende (blau) des Versuchstages. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die transparent dargestellten Originalkurven geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.





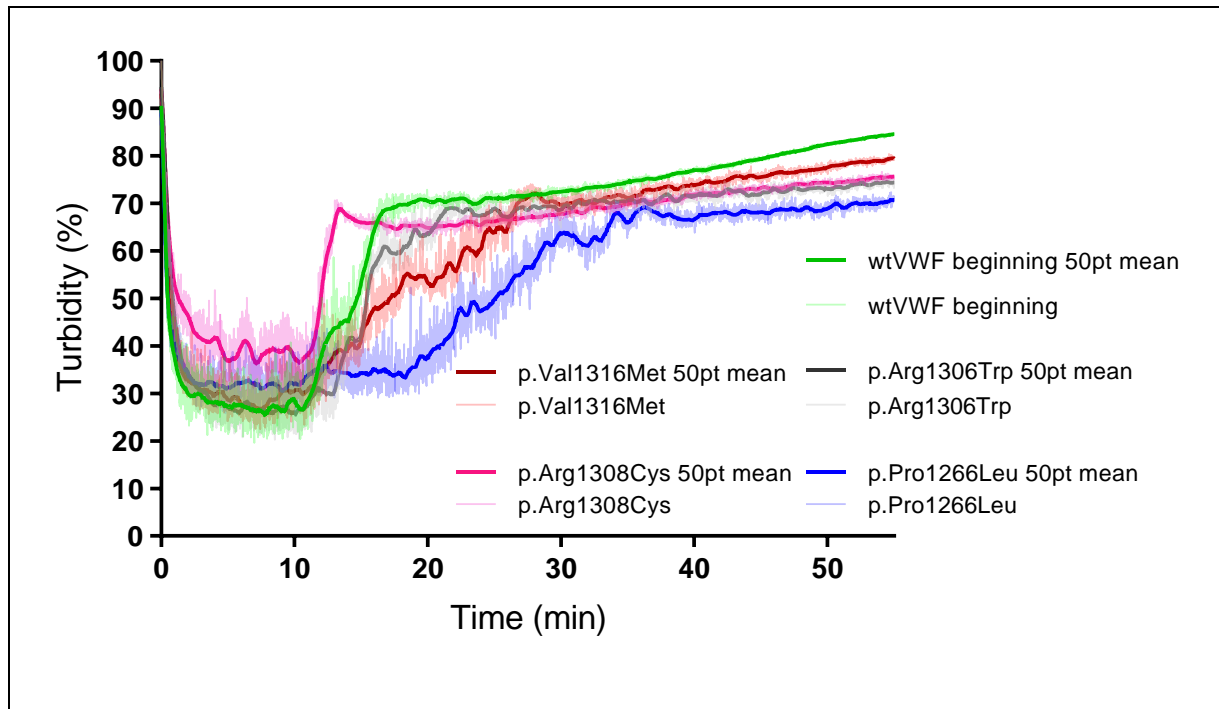
In **Abbildung 17** werden die aufgenommenen Messwerte der drei Versuchstage der VWF-Variante **p.Pro1266Leu** einzeln dargestellt. Hierbei erkennt man, dass die Messwerte der ersten zwei Versuchstage nahezu identisch sind. Der Kurvenverlauf des dritten Versuchstages unterscheidet sich deutlich von dem der anderen Tage. Dies könnte daran liegen, dass sich ein großes Aggregat gebildet hat, wodurch es möglicherweise zur Ausbildung eines Fadens im Strudel des Magnetrührers kommt. Dies kann vorkommen und wirkt störend auf die Messung. Deshalb wurde der Mittelwert der Steigung nur von den ersten zwei Versuchstagen berechnet (**Abbildung 20**).



**Abbildung 17: Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von p.Pro1266Leu-Thrombozyten-Komplexen.** An drei Versuchstagen wurde die Komplexbildung von VWF-Variante p.Pro1266Leu mit Thrombozyten mit einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer gemessen. In einer Glasküvette wurden p.Pro1266Leu (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), Thrombozyten ( $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) und Ristocetin (0,6 mg/mL) im Plättchenresuspensionspuffer vermengt. Nach 12 Minuten wurde zur Proteolyse der Komplexe wtADAMTS13 (1.000 ng/mL) hinzugegeben. Der Graph zeigt den gemittelten Kurvenverlauf der Turbidität in % über 55 Minuten aus allen drei Versuchen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die transparent dargestellten Originalkurven geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.

Die aggregometrische Messung der VWF-Varianten **p.Val1316Met**, **p.Arg1306Trp**, **p.Arg1308Cys** und **p.Pro1266Leu** ist in **Abbildung 18** im Vergleich zum wtVWF dargestellt. Die Komplexbildung der VWF-Varianten **p.Val1316Met**, **p.Arg1306Trp** und **p.Pro1266Leu** ist mit der des wtVWF vergleichbar, da diese ebenfalls zu einer Senkung der Turbidität auf ca. 29% führte. **P.Arg1308Cys** aggregiert hingegen etwas weniger stark (ca. 39% Turbidität). Nach Zugabe von wtADAMTS13 stieg die

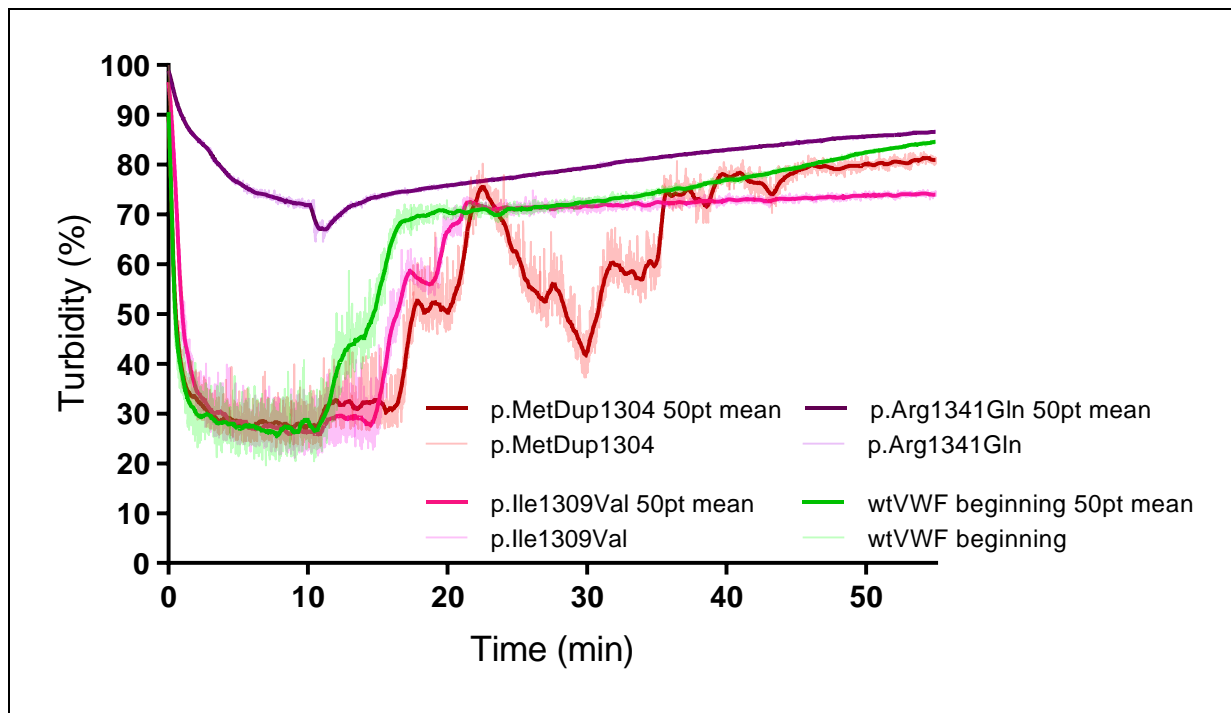
Turbidität bei den VWF-Varianten unterschiedlich stark an, was darauf hinweist, dass die Proteolyse unterschiedlich schnell verlief. Zum Vergleich werden in **Abbildung 20** die Steigungen der Turbiditätskurven am steilsten Punkt als Balkendiagramm dargestellt.



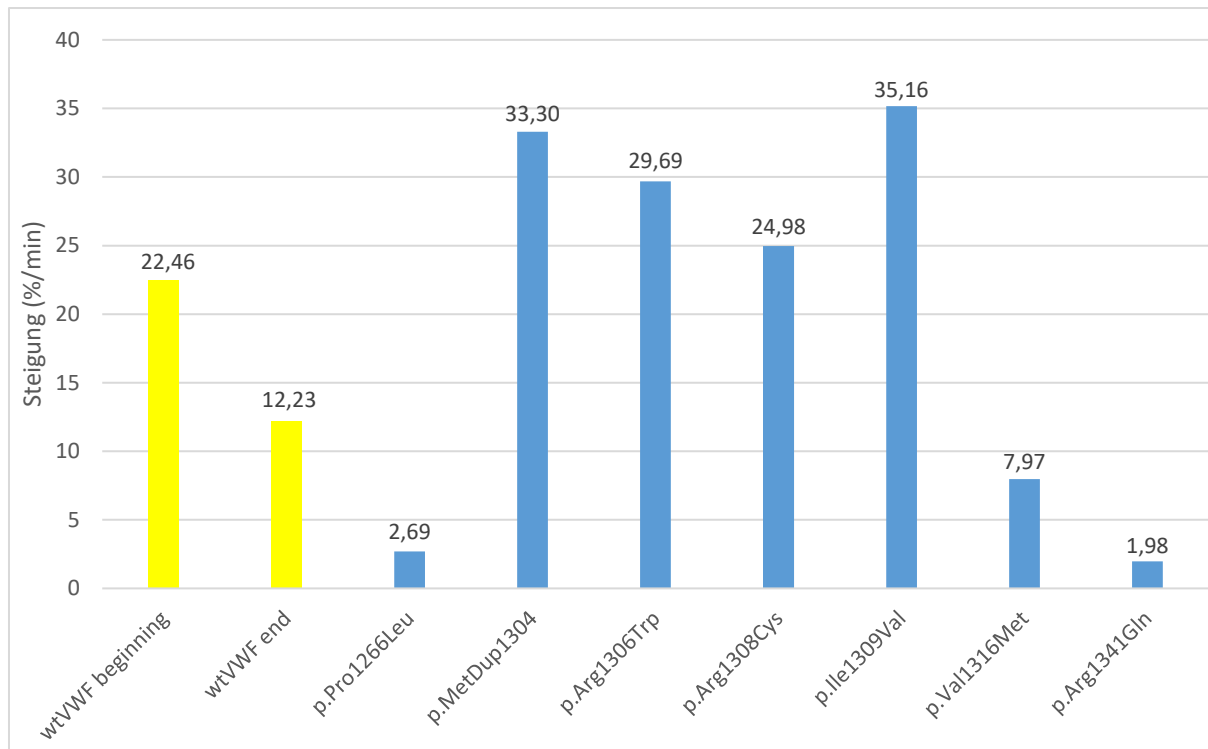
**Abbildung 18: Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von vier VWF-Varianten-Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF.** An drei Versuchstagen wurde die Komplexbildung von unterschiedlichen VWF-Varianten (p.Val1316Met, p.Arg1306Trp, p.Arg1308Cys, wtVWF und p.Pro1266Leu) und Thrombozyten mit einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer gemessen. In einer Glasküvette wurden die angegebenen rekombinanten VWF-Varianten (10 µg/µL), Thrombozyten (300 · 10<sup>3</sup> Zellen/µL) und CaCl<sub>2</sub> (1 mM) im Plättchenresuspensionspuffer vermengt. Die Zugabe von Ristocetin (0,6 mg/mL) war nur bei wtVWF und p.Pro1266Leu nötig. Nach 12 Minuten wurde zur Proteolyse der Komplexe wtADAMTS13 (1.000 ng/mL) hinzugegeben. Der Graph zeigt den gemittelten Kurvenverlauf der Turbidität in % über 55 Minuten aus allen drei Versuchen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die transparent dargestellten Originalkurven geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.

Die VWF-Variante **p.Arg1341Gln** unterscheidet sich in der Komplexbildung sowie in der Proteolyse anscheinend stark vom wtVWF (**Abbildung 19**). Die Turbidität der VWF-Variante **p.Arg1341Gln** sinkt nur bis ca. 64% und weist eine geringere Steigung während der Proteolyse auf (1,98 %/min, **Abbildung 20**). Die VWF-Varianten **p.MetDup1304** und **p.Ile1309Val** unterscheiden sich lediglich im enzymatischen Abbau durch wtADAMTS13 (**Abbildung 19**). Der Verlauf der Turbidität während der Proteolyse von VWF **p.Ile1309Val** ist mit dem des wtVWF vergleichbar. Bei den **p.Ile1309Val**-Thrombozyten-Komplexen stagniert der Anstieg der Turbidität zwischen 17,5 und 18,5 Minuten bevor er weiter ansteigt. Dieser Verlauf war bei allen drei Ver-

suchen zu beobachten. Der Kurvenverlauf bei der VWF-Variante **p.MetDup1304** deutet daraufhin, dass sich nach erfolgter Proteolyse der Komplexe neue Komplexe bilden, welche wiederholend proteolysiert werden.

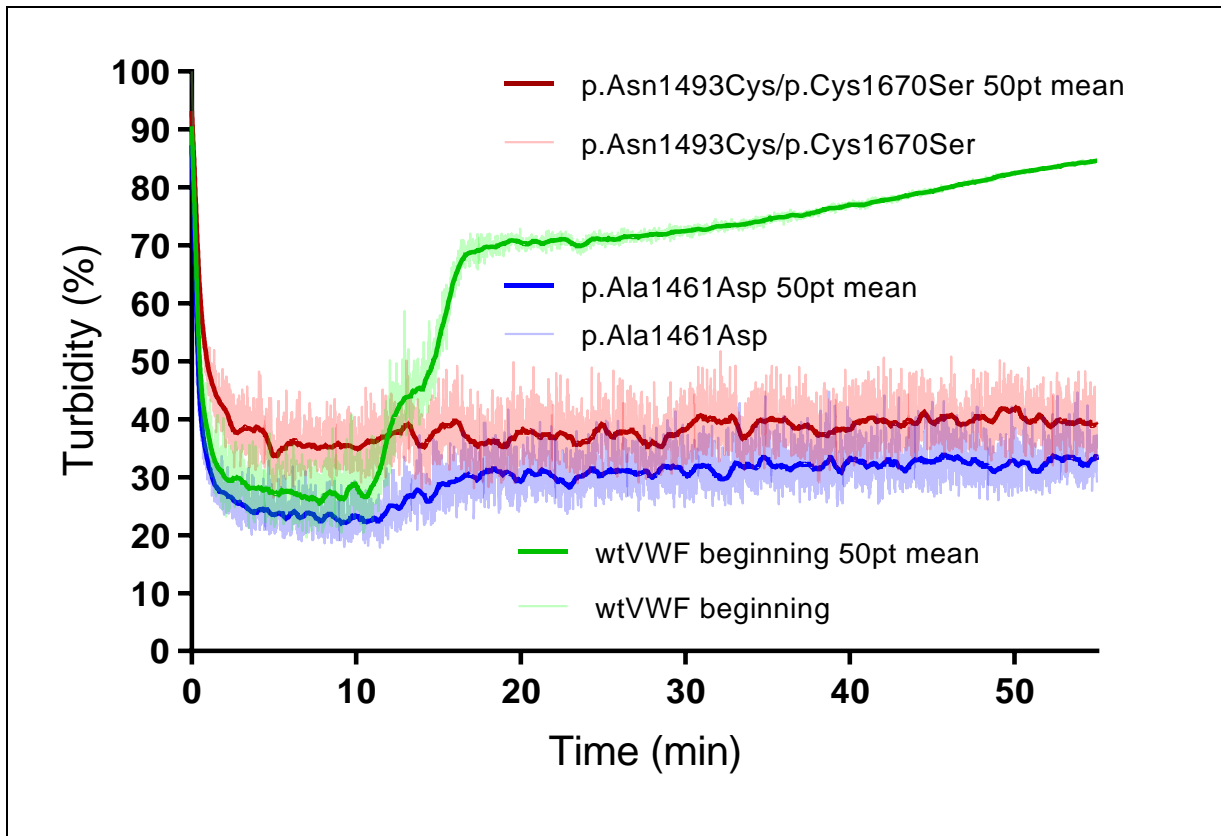


**Abbildung 19: Verlauf der Bildung und der Proteolyse von drei VWF-Varianten-Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF.** An drei Versuchstagen wurde die Komplexbildung von unterschiedlichen VWF-Varianten (p.Arg1341Gln, p.MetDup1304, wtVWF und p.Ile1309Val) und Thrombozyten mit einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer gemessen. In einer Glasküvette wurden die entsprechenden VWF-Varianten (10 µg/µL), Thrombozyten (300 ·10<sup>3</sup> Zellen/µL), CaCl<sub>2</sub> (1 mM) im Plättchenresuspensionspuffer vermengt. Die Zugabe von Ristocetin (0,6 mg/mL) war nur bei wtVWF und p.Arg1341Gln nötig. Nach 12 Minuten wurde zur Proteolyse der Komplexe wtAD-AMTS13 (1.000 ng/mL) hinzugegeben. Der Graph zeigt den gemittelten Kurvenverlauf der Turbidität in % über 55 Minuten aus allen drei Versuchen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die transparent dargestellten Kurven geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.



**Abbildung 20: Vergleich der Proteolyse von VWF-Thrombozyten-Komplexen anhand der Steigung des Turbiditätsverlaufes.** Die Steigung ist in %/min angegeben. Berechnet wurde sie jeweils in dem Zeitbereich nach Zugabe von ADAMTS13 mit dem steilsten Anstieg. Für wtVWF, p.MetDup1304, p.Arg1306Trp, p.Arg1308Cys und p.Ile1309Val wurde ein Zeitbereich von einer Minute gewählt. Bei p.Pro1266Leu 9 Minuten, p.Val1316Met 3,3 Minuten und bei p.Arg1341Gln 4 Minuten.

VWF **p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser** ist eine Doppeltmutante und dient bei dieser Versuchsreihe als Negativkontrolle. Hierbei handelt es sich um eine Basenpaarsubstitution, jedoch in zwei Bereichen auf dem VWF-Gen. Normalerweise ist die A2-Domäne beim wtVWF geöffnet. Bei dieser Mutante ist sie jedoch durch eine neu entstehende Disulfidbrücke permanent geschlossen, weshalb die Schnittstelle für ADAMTS13 nicht frei liegt und VWF nicht geschnitten werden kann (Baldauf et al. 2009). In **Abbildung 21** ist zu erkennen, dass nach Zugabe von wtADAMTS13 die Turbidität weiterhin bei ca. 38% stagniert und damit die VWF-Plättchen-Komplexe nicht geschnitten werden. Bei VWF **p.Ala1461Asp** werden die Komplexe nur minimal geschnitten, da sich die Turbidität von 23,4% auf ca. 31,7% steigert.



**Abbildung 21: Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von zwei VWF-Varianten-Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF.** An drei Versuchstagen wurde die Komplexbildung von unterschiedlichen VWF-Varianten (p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser, wtVWF und p.Ala1461Asp) und Thrombozyten mit einem 2-Kanal Light Transmission Aggregometer gemessen. In einer Glasküvette wurden die entsprechenden VWF-Varianten (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), Thrombozyten ( $300 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{L}$ ) und  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) im Plättchenresuspensionspuffer vermengt. Die Zugabe von Ristocetin (0,6 mg/mL) war nur bei wtVWF und p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser nötig. Nach 12 Minuten wurde zur Proteolyse der Komplexe wtADAMTS13 (1.000 ng/mL) hinzugegeben. Der Graph zeigt den gemittelten Kurvenverlauf der Turbidität in % über 55 Minuten aus allen drei Versuchen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die transparent dargestellten Kurven geglättet. Dazu wurde jeweils der Mittelwert über 50 Messwerte erstellt, durch die ein Polynom 6. Ordnung gelegt wurde.

## **4. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob ADAMTS13 in der Lage ist, 2B-VWF-Plättchen-Aggregate durch proteolytische Spaltung der VWF-Varianten unter Fluss aufzulösen. Dafür sollten zur Messung der Proteolyse von Aggregaten aus Thrombozyten und VWF-Varianten unter Flussbedingungen zwei diagnostiktaugliche Assays entwickelt werden. Diese sollen die physiologischen Bedingungen im Blut simulieren, unter denen VWF durch ADAMTS13 gespalten wird.

Mit Hilfe der zwei entwickelten Methoden sollte zum einen die Funktionsweise der ADAMTS13 an oberflächengebundenem und zum anderen an zirkulierendem VWF unter Flussbedingungen untersucht werden.

Zur Erforschung der Proteolyse von VWF-Fäden auf einer Oberfläche wurden verschiedene Kanal-Slides mit unterschiedlichen Reagenzien beschichtet, um zunächst zu untersuchen, woran VWF binden und Fäden bilden kann. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Beschichtungen sowie deren weitere Entwicklung diskutiert.

Für die Simulation der Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Aggregate in der Blutzirkulation wurde ein Aggregometer Assay entwickelt. Dabei erfolgt die Simulation der Aggregatbildung verschiedener VWF-Varianten mit Thrombozyten in einer Küvette unter Scherfluss. Die Ergebnisse des Assays werden nachfolgend diskutiert.

### **4.1. wtVWF-Fadenbildung an unterschiedlichen Oberflächen unter Flussbedingungen**

Für die Simulation der Proteolyse von VWF-Fäden an einer Oberfläche sollte ein zellfreies Assay entwickelt werden. Dafür wurden verschiedene Kanal-Slides mit unterschiedlichen Reagenzien beschichtet, um zu untersuchen, woran VWF binden und Fäden bilden kann. Im Anschluss sollte überprüft werden, ob diese VWF-Fäden von der Protease ADAMTS13 geschnitten werden können. Bei der Entwicklung wurde darauf geachtet, die physiologischen Bedingungen des Blutes bestmöglich nachzubilden.

Nach einer Gefäßverletzung bindet VWF bei erhöhtem Scherstress als erste Reaktion an das freiliegende Kollagen (Tomokiyo et al. 2005), zudem besitzt VWF eine Bindungsstelle für Fibrin, das aus Fibrinogen entsteht (Keuren et al. 2004). Daher würde nahe liegen, dass VWF an einem mit Kollagen oder Fibrinogen beschichteten

Kanal-Slide binden und Fäden bilden kann. Jedoch ist das Resultat der Flussversuche, dass keine VWF-Bindung und damit Fadenbildung stattgefunden hat. Dabei besteht die Vermutung, dass die physiologischen Bedingungen des Blutes nicht hinreichend simuliert worden sind. Deshalb wurden Sephacryl Beads für die Nachbildung von Blutkörperchen eingesetzt und die Viskosität an die des Blutes angepasst. Damit wurde die Blutbeschaffenheit mit dessen wichtigen Bestandteilen bei der Entwicklung beachtet. Die Ergebnisse der Flussversuche zeigen jedoch, dass VWF gleichermaßen an Verunreinigungen sowie an Sephacryl- und anderen Beads bindet (**Abbildung 7** und **Abbildung 8**) und nicht an der mit Kollagen beschichteten Oberfläche. Damit ist eine unspezifische VWF-Bindung naheliegend, die dazu führt, dass VWF lediglich einen Ankerpunkt für die Anhaftung benötigt, um anschließend Fäden bilden zu können. Diese Annahme wurde durch den nachfolgenden Versuch bestätigt. Hierbei wurden keine Sephacryl Beads verwendet und man erkennt, dass sich dennoch VWF Fäden unspezifisch an einem Faden, welcher eine zufällige Verunreinigung auf dem Slide darstellt, ausbilden (**Abbildung 9**). Demzufolge muss der VWF nicht heruntergedrückt werden, um zu binden und Fäden bilden zu können, so wie anfangs vermutet.

Aufgrund dieser Schlussfolgerungen wurden verschieden große Polystyrene Beads verwendet, an denen sich VWF- Fäden gebildet haben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fäden bei geringer Scherrate von  $1.046 \text{ s}^{-1}$  sowie teilweise bei  $528 \text{ s}^{-1}$  abreißen. Damit das Assay für die Diagnostik geeignet ist, sollte an jedem Bead ein Faden ausgebildet sein, die einer konstanten Scherrate von mindestens  $528 \text{ s}^{-1}$  standhalten können. Es wurde von der AG Brehm eine mikrofluidische Analysemethode etabliert, bei der adhärenente Endothelzellen unter Flussbedingungen VWF-Fäden auf ihrer Oberfläche sekretieren (Kraus et al. 2014). Dabei können die VWF-Fäden einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  standhalten. Daher sollten auch bei diesem Assay ca.  $500 \text{ s}^{-1}$  eingehalten werden, um die anschließende Proteolyse der VWF-Fäden hinreichend simulieren zu können. Im weiteren Versuch konnte die Anzahl der Fäden durch die Erhöhung der Viskosität mit dem Einsatz von Methylcellulose nicht gesteigert werden. Daher resultiert aus den Ergebnissen der Versuche, dass zum einen die Adsorption vom VWF an die Beads nicht ausreichend stabil ist und zum anderen ist die Anzahl der Fäden für ein diagnostiktaugliches Assay nicht zufriedenstellend.

Weiterhin wurden carboxylierte Beads verwendet, die mit verschiedenen Proteinen über eine Carboxyl-Gruppe funktionalisiert werden können. Mit den anti-VWF-Beads



wurden verschiedene Beschichtungsansätze ausprobiert, die zu ähnlichen Ergebnissen wie die Versuche mit den Polysytrenen Beads geführt haben. Erwähnenswert ist die Annahme, dass sich VWF-Fäden erst ab  $739 \text{ s}^{-1}$  bilden, da bei einer Scherrate von  $528 \text{ s}^{-1}$  die Fadenbildung ausbleibt. Dies ist jedoch ungünstig, da die Fäden bei  $739 \text{ s}^{-1}$  mechanisch abreißen. Daraus folgt, dass eine Antikörper-VWF-Bindung nicht ausreichend stabil zu sein scheint und eine unspezifische Bindung nicht ausgeschlossen ist. Weiterhin bilden sich VWF-Fäden nicht an allen anti-VWF-Beads, was daran liegen kann, dass der Antikörper nicht an alle Beads gebunden hat oder dieser von der Hitze beim Anschmelzen zerstört wurde.

Auch die Versuche mit den Kollagen-Beads beschichteten Slides führten zu den gleichen Ergebnissen und damit auch zu denselben Schlussfolgerungen. Lediglich die Kollagen-Kopplung an die Beads im Slide hat zu einem anderen Ergebnis geführt. Hierbei erkennt man an den Beads das Kollagen, welches sich anscheinend untereinander quervernetzt hat. Unter Fluss haben sich innerhalb weniger Sekunden Fäden gebildet, die untereinander oder mit dem Kollagen quervernetzt sind, was in **Abbildung 14** sehr deutlich zu erkennen ist. Diese waren nur an den Beads lokalisiert, was auf eine spezifische VWF-Kollagen-Bindung hinweist. Bei einer Scherrate von  $4.011 \text{ s}^{-1}$  reißen die Fäden nicht ab und sind damit stabiler, als die Fäden in den Vorversuchen. Damit waren die anfangs erläuterten Kriterien für ein diagnostisches Assay erfüllt und es konnte zum Einsatz von ADAMTS13 kommen. Jedoch hat keine Proteolyse stattgefunden, auch nicht nach Erhöhung der ADAMTS13 Konzentration ( $10.000 \text{ ng/mL}$ ). Aus der Tatsache, dass sich kleine Abschnitte der Fäden beim Umschalten der Pumpe bewegt haben, lässt sich ableiten, dass das Kollagen während der Kollagen-Beads Kopplung nicht nur an den Beads gebunden hat, sondern auch z.T. am Kanalboden. Dadurch bindet VWF vermutlich zunächst unter Fluss an die Beads und anschließend an das Kollagen, welches am Kanalboden gebunden ist. Ansonsten würde es zum gleichen Ergebnis wie bei dem Flussversuch mit den Kollagen-Beads führen, was jedoch keine so starke Fadenbildung hervorgerufen hat. Daher kann die ADAMTS13 wahrscheinlich die Fäden schneiden, jedoch bleiben die Fäden aufgrund der Quervernetzungen am Slide-Boden haften. Diese Annahme lässt sich aufgrund der Erhöhung des Scherstresses von  $1.462 \text{ s}^{-1}$  auf  $4.011 \text{ s}^{-1}$  bestätigen, da die Fäden hierbei nicht mechanisch zerstört wurden.

Aus Zeitgründen konnten keine weiteren Optimierungsschritte durchgeführt werden. Jedoch liefern die Resultate der ausgeführten Flussversuche relevante Schlussfolge-

rungen für weitere Optimierungsschritte und damit die Entwicklung eines zellfreien Assays.

Bei weiteren Versuchen mit Kollagen könnte die eingesetzte Konzentration von 500 µg/mL um die Hälfte reduziert werden, wodurch eventuell die starke Quervernetzung verhindert werden könnte. Andererseits könnte genau diese dafür ausschlaggebend sein, sodass sich Fäden bilden können. Die optimale Kollagen-Konzentration sollte eine Erhöhung der Fadenbildung fördern und gleichzeitig die Proteolyse nicht behindern. Des Weiteren muss eine gleichmäßige Verteilung der Beads im Kanal-Slide sichergestellt werden, um eine reproduzierbare Methode etablieren zu können.

Die VWF Typ 2B Varianten, die später mit dem Assay untersucht werden sollen, werden durch Mutationen in der A1-Domäne ausgelöst, in der unter anderem die Bindungsstellen für Kollagen VI und IV lokalisiert sind (Schneppenheim und Budde 2008; Slobodianuk et al. 2019). Nach weiteren Optimierungen des Assays wäre es interessant, zu sehen, ob die Mutationen die Bindung an diese Kollagene beeinflusst, indem untersucht wird, ob die VWF-Varianten besser oder schlechter an die Kollagen-Beads binden und Fäden bilden können.

Darüber hinaus könnte an die carboxylierten Beads wtVWF sowie die VWF-Varianten gekoppelt werden, um anschließend ein Kanal-Slide mit den Beads zu beschichten und VWF herüberströmen zu lassen. Dies würde jedoch eine zeitintensivere Vorbereitung bedeuten, da für jede VWF-Variante eine einzelne Kopplung an die Beads stattfinden müsste. Außerdem ist unklar, ob der VWF an den gekoppelten Beads unter Flussbedingungen anschließend auch binden und stabile Fäden bilden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode nach weiteren Optimierungsschritten eine leicht zu handhabende, zeitsparende und kostengünstige Analysemethode für die Diagnostik darstellen könnte. Diese Methode hat das Potential im Forschungsbereich eine gute Ergänzung zu bereits etablierten Assays darzustellen, da das zellfreie Assay den Einsatz von Endothelzellen oder Plättchen überflüssig macht. Ziel weiterer Forschung wird es sein, die Methode auf der Grundlage der bereits erhaltenen Erkenntnisse für den Einsatz in Diagnostik und Forschung zu optimieren.

#### 4.2. Proteolyse von VWF-Varianten im LTA

Für die Simulation der Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Aggregate in der Blutzirkulation wurde zunächst ein Assay entwickelt und optimiert, mit dem anschließend die Proteolyse von wtVWF sowie VWF-2B-Varianten gemessen worden ist. Die Aggregation von VWF und gewaschen Plättchen wurde in einem LTA simuliert.

Die untersuchten VWF-2B-Varianten werden durch Mutationen in der A1-Domäne ausgelöst und weisen eine erhöhte GPIIb $\alpha$ -Affinität auf, die eine verstärkte Bindung der VWF Multimere an die Thrombozyten zur Folge hat. Dies führt dazu, dass sich in der Blutbahn spontan VWF-Thrombozyten-Aggregate bilden. In der Folge kann es zu einer Thrombozytopenie kommen, die bei den Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Weiterhin wird bei einigen VWS Typ 2B Patienten ein erhöhter Abbau von VWF durch ADAMTS13 beobachtet (Raves et al. 2007), der mit dem hier entwickelten LTA-Assay untersucht werden sollte.

LTA findet bereits bei der Untersuchung der Plättchenaggregation bei Gerinnungsstörungen vielseitige Verwendung. Hierbei wird mit Plättchen von Mäusen oder mit menschlichem Plasma gearbeitet (Hvas und Favaloro 2017).

Für die Entwicklung eines zellfreien Assays wurden GPIIb $\alpha$ -Latexbeads als Ersatz für Plättchen getestet. Das verwendete Kit wurde von Siemens für einen funktionellen Test entwickelt, um zu überprüfen, wie viel VWF beim Patienten im Blut gebildet wird und ob diese Moleküle funktionsfähig sind (Patzke et al. 2014). Damit sollte der VWF am GPIIb $\alpha$ -Peptid der Beads binden und Komplexe bilden, was allerdings nicht passiert ist. Es könnte sein, dass die Komplexbildung bei einer höheren Bead-Konzentration stattgefunden hätte. Jedoch wäre das für ein reproduzierbares, diagnostisches Assay nicht sinnvoll, da es zu kostspielig sein würde, weshalb keine weiteren Versuche mit den Latexbeads durchgeführt worden sind. Möglich wäre auch, dass die Komplexbildung im LTA nicht sichtbar ist, da die Beads wesentlich kleiner sind als Plättchen und sich die Turbidität nach der Bindung daher nicht stark genug ändert.

Demzufolge wurden Plättchen aus Buffy Coats verwendet, da diese bei der Plasmaherstellung aus Blutspenden zurückbleiben und große Mengen an Plättchen liefern. Zunächst wurde überprüft, ob die untersuchten VWF-Varianten Ristocetin für die Komplexbildung benötigen, da 2B-Mutanten durch spontane VWF-Thrombozyten-Aggregation charakterisiert sind. Es wurde bereits von der AG Schneppenheim ein

statischer GPIIb $\alpha$ -Bindungsassay mit den VWF-Varianten durchgeführt, mit dem die GPIIb $\alpha$ -Bindung bei unterschiedlichen Ristocetin-Konzentrationen bestimmt wurde (persönliche Mitteilung M. Brehm, unveröffentlichte Daten). Die Ergebnisse zeigen, dass kein Ristocetin, bzw. nur eine geringere Ristocetin-Konzentration bei den VWF-Varianten im Vergleich zum wtVWF nötig sind, um eine GPIIb $\alpha$ -Bindung hervorzurufen (**Abbildung 22**). Unter Flussbedingungen resultieren ähnliche Ergebnisse: wtVWF sowie **p.Pro1266Leu** benötigen Ristocetin (0,6 mg/mL), um an den GPIIb $\alpha$ -Rezeptor der Plättchen zu binden und Aggregate zu bilden. Dies ist im statischen GPIIb $\alpha$ -Bindungsassay ebenfalls der Fall. Die VWF-Varianten **p.Arg1308Cys**, **p.Ala1461Asp**, **p.Val1316Met**, **p.Ile1309Val**, **p.Arg1306Trp** und **p.MetDup1304** benötigen unter Flussbedingungen kein Ristocetin, um an Plättchen binden zu können. Ebenso findet unter statischen Bedingungen bei den fünf VWF-Varianten bereits ohne die Zugabe von Ristocetin eine GPIIb $\alpha$ -Bindung statt und erhöht sich mit einer höheren Ristocetin-Konzentration. Im LTA ist damit die gain-of-function dieser Mutanten genauso gut zu erkennen wie im statischen Assay. Des Weiteren muss der direkte Vergleich der sechs VWF-Varianten mit wtVWF vorsichtig betrachtet werden, da beim wtVWF Ristocetin zur Ausbildung der Komplexe gegeben wurde im Gegensatz zu den sechs VWF-Varianten.

Verglichen mit dem statischen Assay sollte VWF **p.Arg1341Gln** unter Flussbedingungen kein bzw. weniger Ristocetin für die Komplexbildung benötigen, was nicht der Fall war und später diskutiert wird. VWF **p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser** dient als Negativkontrolle und wurde von der AG Brehm noch nicht im GPIIb $\alpha$ -Bindungsassay erfasst, weshalb kein Vergleich stattfinden kann.

Die Messungen mit wtVWF zu unterschiedlichen Zeiten des Versuchstages zeigten, dass die Proteolysegeschwindigkeit mit dem Alter der Plättchen abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass die Plättchen nur für einen bestimmten Zeitraum nach der Isolierung für diese Versuche geeignet sind. Damit sollten die Versuche nicht mehr als drei bis vier Stunden nach der Plättchenisolierung durchgeführt werden. Die Differenz der Steigung des wtVWF, welcher am Anfang und Ende eines Versuchstages gemessen wurde, liegt bei ca. 10 %/min und sollte bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Während dieser Arbeit wurden die Mutanten immer in derselben Reihenfolge gemessen. Es wurde aber nicht beobachtet, dass die Mutanten umso schlechter proteolysiert wurden, je älter die Plättchen waren. Es kann damit davon

ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen in der Proteolyse tatsächlich auf die Mutationen zurückzuführen sind.

Die Komplexe der untersuchten VWF Typ 2B Varianten **p.Val1316Met** und **p.Pro1266Leu** werden im Vergleich zum wtVWF langsamer von wtADAMTS13 geschnitten. Jong und Eikenboom weisen für **p.Val1316Met** eine sehr starke GPIIb- Bindung nach, wodurch vermutlich diese Variante langsamer von ADAMTS13 geschnitten wird. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die spontan gebildeten, freizirkulierenden VWF-Plättchen-Aggregate in der Blutbahn von betroffenen Patienten langsamer von wtADAMTS13 abgebaut werden als bei anderen VWF Typ 2B-Varianten. Dadurch stehen die Thrombozyten sowie der VWF der Blutgerinnung nicht zu Verfügung, was sich durch längere Blutungszeiten und einer stärker ausgebildeten Thrombozytopenie im Gegensatz zu anderen 2B-Varianten zeigt. Daher wirken sich die untersuchten Mutationen, die eine geringe Steigung im Assay haben, im Vergleich zum wtVWF, mehr auf die Blutgerinnung aus als Mutationen mit größeren Steigungen. Dem Zufolge werden die Varianten **p.MetDup1304** und **p.Ile1309Val** am Schnellsten proteolysiert, da die Steigung am größten ist.

Die Variante **p.MetDup1304** wies in allen drei Versuchen einen ungewöhnlichen proteolytischen Verlauf auf. Diese Variante scheint zunächst im Vergleich zum wtVWF schneller von wtADAMTS13 geschnitten zu werden, jedoch bilden sich anschließend erneut Komplexe. Dies könnte von der Charge abhängen und man müsste nochmals die gleiche Variante einer anderen Charge messen, um eine genaue Aussage treffen zu können. Des Weiteren wird VWF in Thrombozyten, in den sogenannten  $\alpha$ -Granula, gespeichert. Bei Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Ausschüttung des VWF (Bowie et al. 1986). Wäre es hier durch **p.MetDup1304** zur Aktivierung der Plättchen und damit zur Sekretion des Plättchen-VWF ins Medium gekommen, hätte dies zur Ausbildung neuer Komplexe führen können, die wiederum von wtADAMTS13 hätten geschnitten werden können. Es gibt aber bisher aus der Literatur keine Hinweise darauf, dass **p.MetDup1304** eine solche Wirkung auf Plättchen hat. Da alle 2B-Varianten eine gain-of-function aufweisen, ist zudem nicht zu vermuten, dass nur diese eine Variante so stark aktivierend wirkt. Um dieses Phänomen aufzuklären sollten weitere Messungen durchgeführt werden. Es wären dabei auch Messungen mit einer anderen Charge empfehlenswert, um auszuschließen, dass der abweichende Verlauf durch die verwendete Proteincharge verursacht wurde.

Die VWF-Variante **p.Arg1341Gln** unterscheidet sich stark in der Komplexbildung sowie Proteolyse vom wtVWF. Da diese Abweichungen durch das Fehlen großer Multimere hervorgerufen werden könnten, wurde eine Multimeranalyse (Schneppenheim und Budde 2008) aller VWF-Varianten von Sonja Schneppenheim, Ulrich Budde und Mitarbeitern (MEDILYS Laborgesellschaft mbH) durchgeführt (**Anhang Abbildung 23**). Hierbei hat sich ergeben, dass alle untersuchten VWF-Varianten, außer **p.Arg1341Gln**, das gleiche Multimermuster, verglichen mit dem wtVWF, aufweisen. Bei **p.Arg1341Gln** wurden zwei Chargen gemessen wodurch festgestellt werden konnte, dass große Multimere bei der verwendeten Charge im Gegensatz zur Referenzprobe fehlen, womit die vorherige Annahme bestätigt wurde. Damit muss eine andere Charge der Variante erneut im Assay gemessen werden, um zu überprüfen, ob das Fehlen großer Multimere die Komplexbildung behindert hat oder andere Parameter während der Messung dafür verantwortlich waren. Daher ist bei dieser Variante der Zusatz von Ristocetin nötig, um eine geringe Komplexbildung zu verursachen, obwohl im statischen GPIIb $\alpha$ -Bindungsassay eine Aggregation ohne Ristocetin erfolgt. Die untersuchte Charge der VWF-Variante **p.Arg1341Gln** zeigt damit kein wesentliches charakteristisches Merkmal einer 2B-Mutation, da VWF Typ 2B Varianten im RIPA-Test geringe Ristocetin-Konzentrationen benötigen (Jong und Eikenboom 2017). Schlussfolgernd können die Daten des Assays für diese VWF-Variante nicht verwendet werden, um eine korrekte Aussage treffen zu können.

Studien von Rayes et al. (2007) weisen darauf hin, dass bei manchen VWS Typ 2B Patienten eine erhöhte Proteolyse des VWF durch ADAMTS13 stattfindet. Obwohl die Sekretion des VWF aus den WPK normal verläuft, ist bei diesen Patienten eine geringe Konzentration an großen Multimeren im Plasma nachweisbar, was mittels einer Multimeranalyse untersucht wird (Rayes et al. 2007). So weisen unter anderem **p.Val1316Met**, **p.Arg1308Cys** und **p.Arg1306Trp** eine geringe Anzahl an großen VWF-Multimeren, im Gegensatz zum Normalplasma auf und gleichzeitig eine erhöhte Konzentration von Abbaubanden. Daher ist ein erhöhter Abbau von VWF-Multimeren durch ADAMTS13 vorhanden, wodurch die Abbaubanden entstehen. **P.Pro1266Leu** dagegen hat ein normales Multimermuster des Plasmas (Casonato et al. 2017). Schlussfolgernd sollte die Steigung bei dem hier entwickelten Assay, bei den genannten VWF-Varianten **p.Val1316Met**, **p.Arg1308Cys** und **p.Arg1306Trp** höher sein als beim wtVWF und bei der Variante **p.Pro1266Leu** kleiner. Bei **P.Arg1306Trp** und **p.Arg1308Cys** wurde im entwickelten Assay eine geringfügig größere Steigung

als beim wtVWF gemessen (**p.Arg1306Trp** 29,69 %/min, **p.Arg1308Cys** 24,98 %/min und wtVWF 22,46 %/min), womit eine schnellere Proteolyse der Komplexe durch ADAMTS13 stattfindet und die Ergebnisse der Multimeranalyse von Casonato et al. (2017) bestätigt werden. Weiterhin wurde bei dem hier entwickelten Assay eine geringere Steigung bei der Variante **p.Pro1266Leu** (2,69 %/min) im Vergleich zum wtVWF gemessen, welches einen langsamen Verdau der VWF-Komplexe durch ADAMTS13 nachweist. Auch hier passen die Ergebnisse mit der Multimeranalyse von Casonato et al. (2017) überein. Bei der Variante **p.Val1316Met** wurde jedoch bei dem hier entwickelten Assay eine geringere Steigung (7,97 %/min) gemessen als beim wtVWF. Die simulierte Proteolyse der VWF-Komplexe der drei VWF-Varianten sind am Ende der Messung gleich groß. Damit ist nach weiteren Optimierungen des Assays zu überprüfen, ob die Geschwindigkeit der Proteolyse der VWF-Thrombozyten-Aggregate im Körper relevant ist, oder eher die Effektivität dessen.

**P.Ala1461Asp** wird als einzige Typ 2B Variante nicht von wtADAMTS13 geschnitten, trotz normaler Multimere der untersuchten Charge. Dies kann aufgrund der Lokalisation der Mutation auf dem *VWF*-Gen hervorgerufen werden. Zu vermuten wäre, dass die Basensubstitution zur veränderten Sekundärstruktur des Proteins führt. Da die Mutation näher an der ADAMTS13 Schnittstelle liegt als die anderen Mutanten, kann diese eventuell schlechter geöffnet werden, weshalb dann keine Proteolyse mehr stattfinden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die simulierte Aggregation sowie Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Komplexe neue Schlussfolgerungen zulässt. Daher wäre das Ziel weiterer Forschung, das Assay für die Diagnostik zu optimieren und zu vereinfachen. Unter anderem könnte die Messzeit von 60 auf 45 Minuten verkürzt werden. Des Weiteren wäre in der Diagnostik zusätzlich zum entwickelten Assay eine Multimeranalyse der untersuchten Probe ratsam, um fälschliche Schlussfolgerungen zu vermeiden. Mit Hilfe dieser Methode könnte untersucht werden, wieso bei manchen VWF Typ 2B Patienten große freizirkulierende VWF-Multimere im Plasma fehlen, indem die Proteolyse der VWF-Varianten durch ADAMTS13 gemessen wird. Das entwickelte Assay wäre nach den empfohlenen Optimierungen in der Diagnostik etablierbar, da es zu einer exakteren Klassifizierung von VWS Typ 2B beiträgt, eine simple Handhabung aufweist, nicht zeitintensiv ist und mit gängigen Geräten im klinischen Bereich realisierbar wäre.

## 5. Zusammenfassung

Der von-Willebrand-Faktor (VWF) ist ein großes, multimeres Glykoprotein, welches vorrangig an der Plättchenadhäsion während der primären Hämostase und der Stabilisierung des Blutgerinnungsfaktors VIII beteiligt ist. Unter erhöhtem Scherfluss des Blutes, wie er bei einer Wunde auftritt, wird der VWF aktiviert und kann damit Blutplättchen (Thrombozyten) rekrutieren, wodurch die Wunde geschlossen wird. Der Abbau und die Regulation des VWF erfolgen nur unter Scherfluss durch ADAMTS13. Mutationen innerhalb des *VWF*-Gens können den enzymatischen Abbau des VWF durch ADAMTS13 beeinträchtigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei diagnostiktaugliche Assays zu entwickeln, die die Funktionsweise der ADAMTS13 zum einen an oberflächengebundenem und zum anderen an zirkulierenden VWF unter Flussbedingungen messen können.

Für die Simulation der VWF-Fadenbildung auf einer Oberfläche wurden in einem Kanal-Slide carboxylierte Beads gebunden und anschließend mit Kollagen beschichtet, an dem sich unter Flussbedingungen VWF-Fäden gebildet haben. Für den Einsatz des Assays in der Diagnostik müssen noch weitere Optimierungsschritte vorgenommen werden, um eine reproduzierbare Methode zu erhalten. Weiterhin muss überprüft werden, ob die VWF-Fäden von ADAMTS13 geschnitten werden können. Damit könnte diese Methode eine gute Alternative zu bereits etablierten Assays darstellen, da das zellfreie Assay den Einsatz von Endothelzellen oder Plättchen überflüssig macht und auch die Untersuchung von VWF-Mutanten erlaubt.

Für die Simulation der Proteolyse freizirkulierender VWF-Plättchen-Aggregate in der Blutzirkulation wurde ein LTA verwendet, indem die Komplexbildung in einer Küvette unter Scherfluss erfolgte. Damit wurde die Proteolyse von unterschiedlichen VWF-Varianten gemessen und gezeigt, dass die meisten VWF Typ 2B Varianten unter Flussbedingungen ohne Ristocetin aggregieren sowie unterschiedlich stark von ADAMTS13 geschnitten werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das entwickelte Assay eine reproduzierbare Methode darstellt, mit der die Simulation der Aggregation und Proteolyse treffend simuliert werden kann. Ziel weiterer Forschung werden die finalen Optimierungen des Assays sowie die Auswertung dieses sein. Das entwickelte Assay wäre nach diesen Optimierungen sehr gut für die Diagnostik geeignet, da es nicht zeitintensiv, einfach zu handhaben und mit gängigen Geräten im klinischen Bereich realisierbar ist.



## IX. Anhang

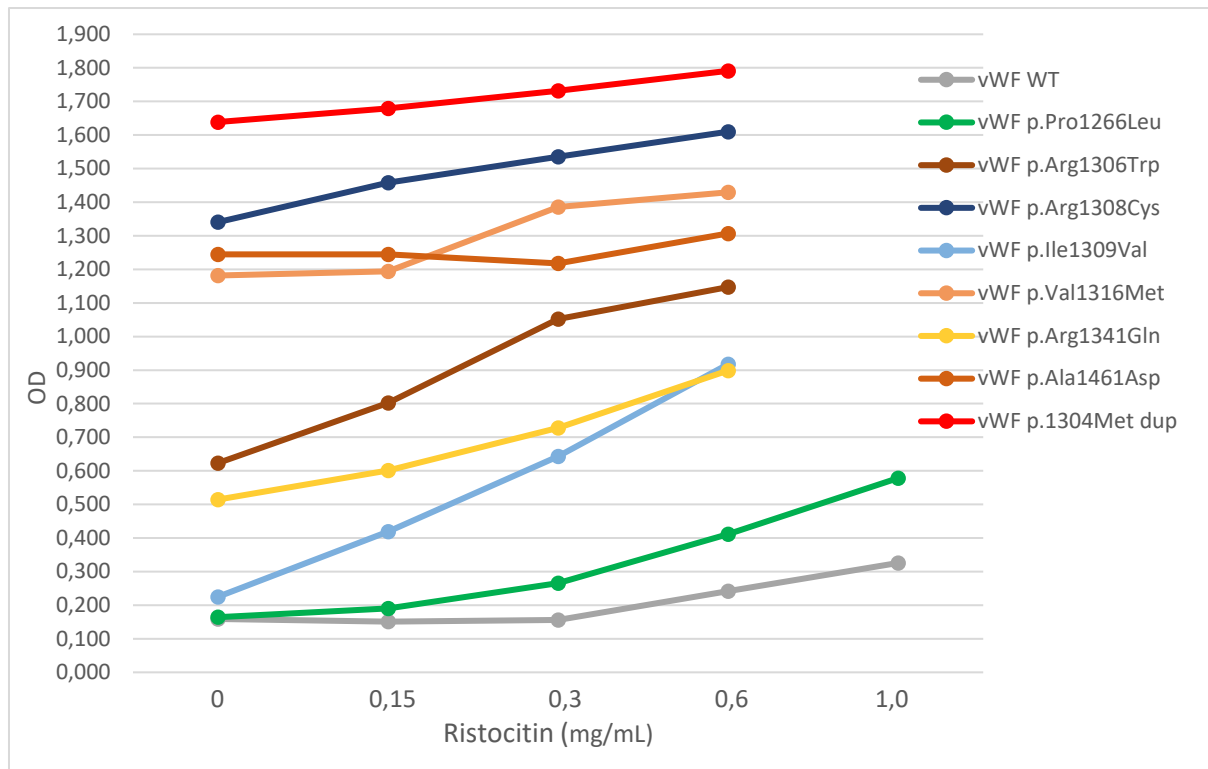
### a. Eingestellte Flusseinstellungen am Ibidi Flusssystem

**Tabelle 2:** Flusseinstellungen während einem Flussversuch bei einem  $\mu$ -Sticky Slide<sup>0.2</sup> Luer.

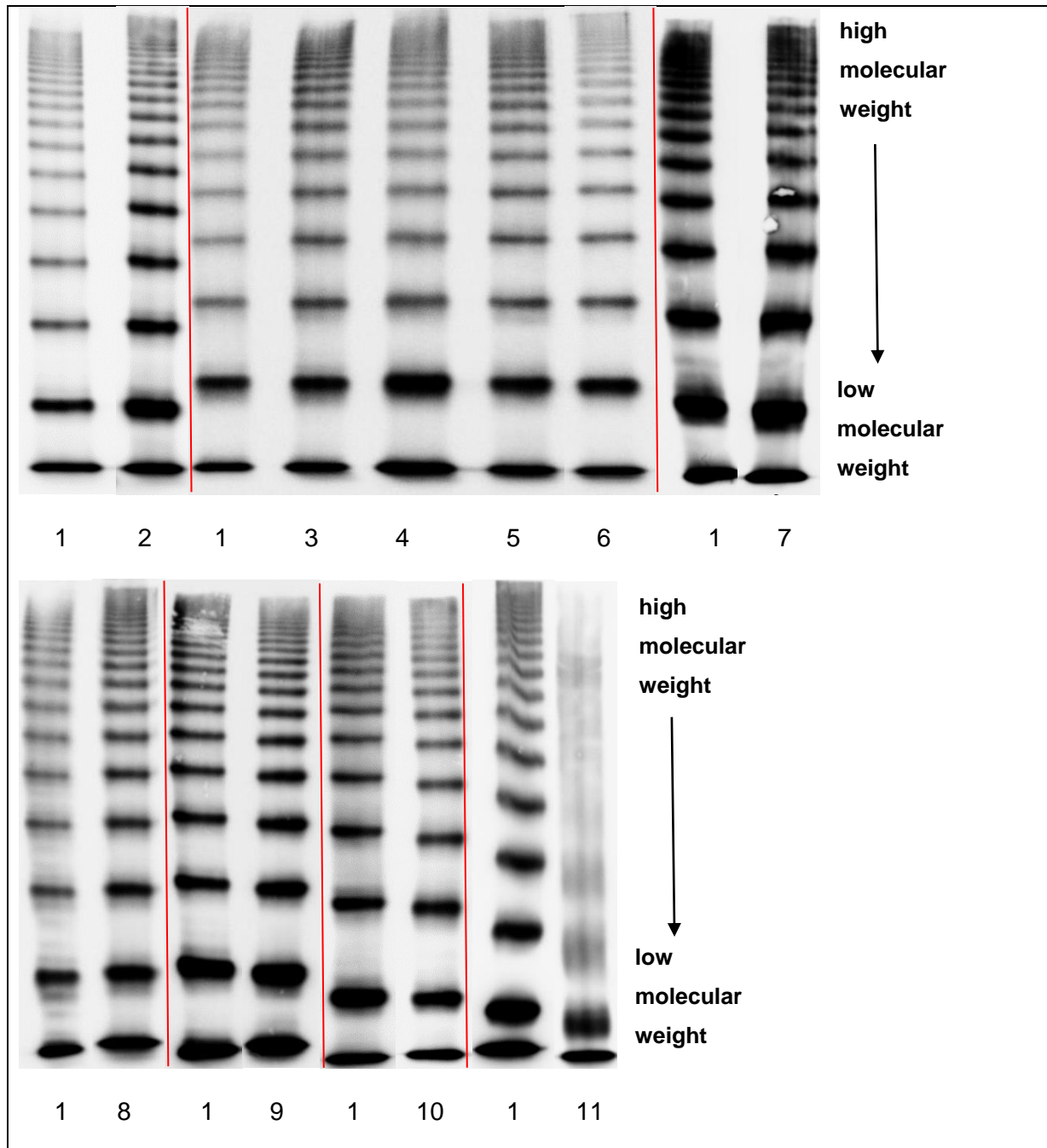
Druck in mbar	Flussrate mL/min	Scherstress dyn/cm <sup>2</sup>	Scherrate 1/s
5	1,03	5,28	528
7	1,44	7,39	739
10	2,04	10,46	1.046
14	2,85	14,62	1.462
15	3,04	15,59	1.559
40	7,82	40,11	4.011
80	14,68	75,30	7.530

**Tabelle 3:** Flusseinstellungen während einem Flussversuch bei einem  $\mu$ -Slide<sup>0.4</sup> Luer.

Druck in mbar	Flussrate mL/min	Scherstress dyn/cm <sup>2</sup>	Scherrate 1/s
7	2,65	3,49	349
14	5,19	6,83	683
15	5,54	7,29	729
40	13,57	17,86	1.786



**Abbildung 22: GPIb $\alpha$ -Bindungskurven verschiedener VWF-Varianten bei unterschiedlichen Ristocetin-Konzentrationen.** Der GPIb $\alpha$ -Bindungsassay, basierend auf einem ELISA, wurde von der AG Brehm (Tobias Obser) durchgeführt und zeigt noch nicht veröffentlichte Daten. Die statische GPIb $\alpha$ -Bindungsaktivität wurde bei unterschiedlicher Ristocetin-Konzentration aufgenommen.



**Abbildung 23: Multimeranalyse verschiedener Typ 2B VWF-Varianten im Vergleich zum wtVWF.** Multimeranalyse verschiedener VWF-Varianten mittels einer SDS-Page. Die Laufrichtung geht von oben nach unten. Große VWF-Multimere werden zurückgehalten und sind somit oben im Gel lokalisiert. Kleinere Multimere bis Dimere haben eine schnellere Laufgeschwindigkeit und sind somit weiter unten lokalisiert. Die Nummerierung des Gels entspricht folgenden VWF-Varianten: 1=wtVWF, 2=p.Asn1493Cys/p.Cys1670Ser, 3=p.Arg1306Trp, 4=p.Arg1308Cys, 5=p.Ile1309Val, 6=p.Val1316Met, 7=p.MetDup1304, 8=p.Ala1461Asp, 9=p.Pro1266Leu, und. Gel 10 und 11 zeigen die Multimere von VWF p.Arg1341Gln von zwei unterschiedlichen Chargen, wobei 11 bei dieser Versuchsreihe verwendet wurde. Die rote Markierung trennt die jeweiligen Gele voneinander.

## b. Verwendete Geräte

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten Geräte, mit Angabe des Modells/Seriennummer und des Herstellers.

Gerät	Modell/Seriennummer	Hersteller
Brutschrank	055219	Heraeus
Cell-Dyn Emerald	41115815	Sysmex
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	1016322	KEYENCE
Feinwaage	56582	Scaltec
Ibidi Perfusion Set	0396	Ibidi
Ibidi Pump System 2.0	P0196	Ibidi
Inkubation System for Microscopy	INUG2E-K13	Tokai HIT
Inkubator	HERAcell 150i	Thermo Scientific
Image Station	-	Kodak
Kühlschrank	303432	Liebherr
CHRONO-LOG	Model 700	Chrono-log Corporation
Magnetrührer	-	IKA
Mikroskop	CKX41	Olympus
Multikanalpipette	Finnpipette F2	Scaltec
Pipetus	9907200	Hirschmann
Pipetus (Pipetboy2)	155 016	Integra
Pipette 0,2 – 2 µL	GA52573	Gilson
Pipette 1-10 µL	GN23803	Gilson
Pipette 5-40 µL	A65205	Labsystems
Pipette 20-100 µL	HA21130	Gilson
Pipette 40-200 µL	A91457	Labsystems
Pipette 200-1.000 µL	A97197	Labsystems
Pipette 100-1.000 µL	GE23777	Gilson
Sterile Werkbank	MSC Advantage 1.2	Thermo Scientific
Sterile Werkbank	94 187 000E	Holten LaminAir
Waage	05878	Scaltec
Wipptisch	Rocky	Labortechnik Fröbel
Wasserbad	10472889C	GFL
Wasserbad	10549797I	GFL
Zentrifuge	5417C	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific

### c. Verwendete Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, mit Angabe der Referenznummer und des Herstellers.

Verbrauchsmaterialien	Referenznummer	Hersteller
μ-Slide   <sup>0,4</sup> Luer	13022516	Ibidi
μ-Sticky Slide   <sup>0,2</sup> Luer	180118/7	Ibidi
Coverslips für Sticky Slides	10812	Ibidi
Centrifugal Filter Units 100.000 kDa	UFC901024	Millipore
Centrifugal Filter Units 30.000 kDa	R2DA98923	Millipore
F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate	442404	Thermo Scientific
Glasküvetten 450 mL	419769	Probe & go Labordiagnostika GmbH
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	72.692.005	Sarstedt
Pipettenspitzen 0,5-20 μL	70.1116.210	Biosphere
Pipettenspitzen 2-100 μL	70.760.212	Biosphere
Pipettenspitzen 100-1250 μL	70.1186.210	Biosphere
Reaktionsgefäße 1,5 mL	72.706.400	Sarstedt
Reaktionsgefäße 2 mL	72.695.500	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15 mL,	62.554.502	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße 50 mL,	62.547.254	Sarstedt
Serologische Pipette 5 mL	86.1253.001	Sarstedt
Serologische Pipette 10 mL	86.1254.001	Sarstedt
Serologische Pipette 25 mL	86.1685.001	Sarstedt
Serologische Pipette 50 mL	86.1689.001	Sarstedt
Stir Bars	91415A	Chrono-Log Corporation
Transferpipette 6 mL	86.1174	Sarstedt
Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	83.3912.002	Sarstedt

### d. Verwendete Chemikalien

**Tabelle 6:** Auflistung der verwendeten Chemikalien, mit Angabe der Referenznummer und Hersteller.

Chemikalien	Referenznummer	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDAC)	705962	Polysciences, Inc.
Adenosintriphosphat (ATP) -freies Wasser	F201A	Promega
Apyrase 1.000 U/mL	061047004	Sigma Aldrich
Bariumchlorid (BaCl <sub>2</sub> )	-	Sigma Aldrich
BSA (Bovine Serum Albumin)	A9418	Sigma Aldrich
Calciumchlorid	1133055	Merck
Kollagen Typ I	354236	CORNING

Kollagen Typ III	1230-01S	South Biotech
Ethanol 100%	2273.1000	Chemsolute
Fibrinogen	F13191	Life Technologies
Glycerin 87%	K10092291	Merck
Paraformaldehyd 20%	15713-S	Electron Microscopy Sciences
Poly-L-Lysine	P4707	Sigma Aldrich
Polybead Carboxylate	24811-2	Polysciences, Inc.
Polybead Polystyrene 25 µm	07313-5	Polysciences, Inc.
Polybead Polystyrene 90 µm	07315-5	Polysciences, Inc.
Protease Inhibitor	04 693 159 001	Roche
Ristocetin 20 mg/mL	11140-99-1	Sigma Aldrich
Sephacryl Beads ~50µm	S-300	Pharmacia
Magermilchpulver	60219	Naturaflor
Methanol 99%	4627.2	Roth
Methylcellulose 400mPa·s	M 0262	Sigma Aldrich
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) 0,75 mM	106688	Merck
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 5 mM	S-7795	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) 5 mM	106329	Merck
Wasser	7732-18-5	Th. Geyer

### e. Verwendete Lösungen und Medien

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten Lösungen/Medien, mit Angabe der Referenznummer und des Herstellers. Bei selbsthergestellten Lösungen, mit Angabe der Zusammensetzung.

Lösung/Medium	Referenznummer	Hersteller/Zusammensetzung
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	T0440	Sigma
BSA 0,1%	-	0,5 g BSA 500 mL 1x PBS
BSA 1%	-	500 µl 5% BSA Stock 49,5 ml 1x PBS
BSA 5%	-	10 g BSA 200 mL 1x DPBS
Beschichtungspuffer für VWF-ELISA	-	0,53 g 5 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,42 g 5 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,05 g 0,75 mM NaN <sub>3</sub> auf 1 L ddH <sub>2</sub> O pH 9,6

Ca-freies Tyrode's Puffer	-	4,0 g NaCl 0,1 g KCl 0,596 g HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) 0,25 g Dextrose 500 mL H <sub>2</sub> O pH 6,5
Carbonatpuffer	-	0,53 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,42 g NaHCO <sub>3</sub> 0,05 g NaN <sub>3</sub> Auf 1 L ddH <sub>2</sub> O pH 9,6
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (1x)	14190-094	Gibco by life technologies
Dimethyl sulphoxide (DMSO) HybriMax	D2650	Sigma
IMUBIND ADAMTS13-ELISA Testpuffer	130530	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND ADAMTS13-ELISA Detection Antibody	130515	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND ADAMTS13-ELISA Enzyme Conjugate	R14923	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND ADAMTS13-ELISA ADAMTS13 Standard 100 ng/ml	130514	Sekisui Diagnostics, LLC
IMUBIND ADAMTS13-ELISA Positive Control 24,0+/-3,6 ng/ml	130425	Sekisui Diagnostics, LLC
INNOVANCE VWF Ac	OPHL03	Siemens
Lipofectamine 2000 Reagent	1234318	Invitrogen
OptiPro Serumfreies Medium (SFM)	1145603	Gibco by life technologies
Paraformaldehyd 4%	-	10 ml 20% Paraformaldehyd 40 ml DPBS
Plättchenresuspensionspuffer	-	200 mL Ca-freier Tyrode Puffer 10 g BSA pH 7,4
PolyLink Coupling Puffer	711336	Polysciences, Inc.
PolyLink Waschpuffer	708087	Polysciences, Inc.
Schwefelsäure 0,5 M	-	49,08 g Schwefelsäure 1 L H <sub>2</sub> O
Standard human Plasma	ORKL17	Siemens
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0,05% (1X)	25300-054	Gibco by life technologies

## f. Verwendete Antikörper

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendete Antikörper, mit Angabe der Referenznummer und Hersteller.

Antikörper	Referenznummer	Hersteller
goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	A11034	Life technologies
goat anti-mouse Alexa Fluor 546	A11003	Life technologies
rabbit anti-human VWF, polyklonal	A0082	Dako
rabbit anti-human VWF-HRP, polyklonal	P0226	Dako

## X. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der molekularen Struktur des VWF-Monomers mit den verschiedenen Domänen sowie den funktionellen Regionen mit Bindungspartnern. ....	3
<b>Abbildung 2:</b> VWF bei der Bildung eines weißen, plättchenreichen Thrombus.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Proteolyse von VWF mittels ADAMTS13.....	7
<b>Abbildung 4:</b> Ibidi Kanal-Slide mit dessen Größenbeschreibung.....	19
<b>Abbildung 5:</b> Aufbau des Ibidi Pumpsystems.....	22
<b>Abbildung 6:</b> Sephacryl Beads nach einem Flussversuch mit Kollagen Typ III beschichtetem Slide und darüber fließendem wtVWF. ....	28
<b>Abbildung 7:</b> Immunfluoreszenz-markierte wtVWF-Fäden auf der Oberfläche von Sephacryl Beads. ....	30
<b>Abbildung 8:</b> Durch Immunfluoreszenz markierte wtVWF-Fäden gebunden an Verunreinigungen. ....	31
<b>Abbildung 9:</b> Durch Immunfluoreszenz markierte wtVWF-Fäden gebunden an Verunreinigungen. ....	32
<b>Abbildung 10:</b> WtVWF kann unter Fluss an Polystyrene Beads binden. ....	34
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung von verschiedenen Beschichtungen des Kanal-Slides. ....	36
<b>Abbildung 12:</b> VWF-Fäden an mit anti-VWF Antikörper gekoppelten carboxylierten Beads. ....	37
<b>Abbildung 13:</b> VWF-Fäden an Kollagen Typ I gekoppelten carboxylierten Beads..	38
<b>Abbildung 14:</b> Proteolyse von wtVWF-Fäden an Kollagen Typ I gekoppelten carboxylierten Beads. ....	39



<b>Abbildung 15:</b> Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von wtVWF-Thrombozyten-Komplexen zu Beginn und am Ende eines Versuchstages. ....	42
<b>Abbildung 16:</b> Steigung des Turbiditätsverlaufes während der Proteolyse von wtVWF-Thrombozyten-Komplexen zu Beginn und am Ende eines Versuchstages..	43
<b>Abbildung 17:</b> Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von p.Pro1266Leu-Thrombozyten-Komplexen.....	44
<b>Abbildung 18:</b> Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von vier VWF-Varianten-Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF.....	45
<b>Abbildung 19:</b> Verlauf der Bildung und der Proteolyse von drei VWF-Varianten-Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF. ....	46
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der Proteolyse von VWF-Thrombozyten-Komplexen anhand der Steigung des Turbiditätsverlaufes. ....	47
<b>Abbildung 21:</b> Verlauf der Komplexbildung und der Proteolyse von zwei VWF-Varianten- Thrombozyten-Komplexen verglichen mit dem wtVWF.....	48
<b>Abbildung 22:</b> GPIIb $\alpha$ -Bindungskurven verschiedener VWF-Varianten bei unterschiedlichen Ristocetin-Konzentrationen.....	II
<b>Abbildung 23:</b> Multimeranalyse verschiedener Typ 2B VWF-Varianten im Vergleich zum wtVWF. ....	III

## XI. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Auflistung des verwendeten Kulturmediums und dessen Zusätze für die Kultivierung der HEK293 Zelllinie. ....	12
<b>Tabelle 2:</b> Flusseinstellungen während einem Flussversuch bei einem $\mu$ -Sticky Slide <sup>0,2</sup> Luer. ....	I
<b>Tabelle 3:</b> Flusseinstellungen während einem Flussversuch bei einem $\mu$ -Slide <sup>0,4</sup> Luer. ....	I
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der verwendeten Geräte, mit Angabe des Modells/Seriennummer und des Herstellers. ....	IV
<b>Tabelle 5:</b> Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, mit Angabe der Referenznummer und des Herstellers. ....	V
<b>Tabelle 6:</b> Auflistung der verwendeten Chemikalien, mit Angabe der Referenznummer und Hersteller.....	V

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten Lösungen/Medien, mit Angabe der Referenznummer und des Herstellers. Bei selbsthergestellten Lösungen, mit Angabe der Zusammensetzung..... VI

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendete Antikörper, mit Angabe der Referenznummer und Hersteller. .... VIII

**XII. Drei-Buchstabencode**

<b>Aminosäure</b>	<b>Drei-Buchstabencode</b>
Alanin	Ala
Cystein	Cys
Aspartat	Asp
Glutamat	Glu
Phenylalanin	Phe
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Lysin	Lys
Leucin	Leu
Methionin	Met
Asparagin	Asn
Prolin	Pro
Glutamin	Gln
Arginin	Arg
Serin	Ser
Threonin	Thr
Valin	Val
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr

**XIII. Literaturverzeichnis**

Baldauf, C.; Schneppenheim, R.; Stacklies, W.; Obser, T.; Pieconka, A.; Schneppenheim, S. et al. (2009): Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (12), S. 2096–2105. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03640.x.

Behrends J.C.; Bischofberger J.; Deutzmann R.; Ehmke H.; Frings S.; Grissmer S. et al. (2010): Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Boender, J.; Eikenboom, J.; van der Bom, J. G.; Meijer, K.; Meris, J. de; Fijnvandraat, K. et al. (2018): Clinically relevant differences between assays for von Willebrand factor activity. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. DOI: 10.1111/jth.14319.

Bowie, E. J.; Solberg, L. A.; Fass, D. N.; Johnson, C. M.; Knutson, G. J.; Stewart, M. L.; Zoecklein, L. J. (1986): Transplantation of normal bone marrow into a pig with severe von Willebrand's disease. In: *The Journal of clinical investigation* 78 (1), S. 26–30. DOI: 10.1172/JCI112560.

Budde, Ulrich; Drewke, Elke; Mainusch, Kerstin; Schneppenheim, Reinhard (2002): Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 28 (2), S. 173–190. DOI: 10.1055/s-2002-27820.

Casonato, Alessandra; Daidone, Viviana; Galletta, Eva; Bertomoro, Antonella (2017): Type 2B von Willebrand disease with or without large multimers: A distinction of the two sides of the disorder is long overdue. In: *PloS one* 12 (6), e0179566. DOI: 10.1371/journal.pone.0179566.

Castaman, Giancarlo; Linari, Silvia (2017): Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease and Rare Bleeding Disorders. In: *Journal of clinical medicine* 6 (4). DOI: 10.3390/jcm6040045.

Crawley, James T. B.; Groot, Rens de; 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.

- Hamilton, K. K.; Sims, P. J. (1987): Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. In: *The Journal of clinical investigation* 79 (2), S. 600–608. DOI: 10.1172/JCI112853.
- Hvas, Anne-Mette; Favalaro, Emmanuel J. (2017): Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1646, S. 321–331. DOI: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_25.
- Ibidi GmbH (Hg.) (2018): Instruction Manual ibidi Pump System. Version 2.1. Online verfügbar unter [https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I\\_1090X\\_PumpSystem/IN\\_1090X\\_pump\\_system.pdf](https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/IN_1090X_pump_system.pdf), zuletzt geprüft am 24.08.2018.
- Jong, Annika de; Eikenboom, Jeroen (2017): Von Willebrand disease mutation spectrum and associated mutation mechanisms. In: *Thrombosis research* 159, S. 65–75. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.09.025.
- Keuren, Jeffrey F. W.; Baruch, Dominique; Legendre, Paulette; Denis, Cécile V.; Lenting, Peter J.; Girma, Jean-Pierre; Lindhout, Theo (2004): von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. In: *Blood* 103 (5), S. 1741–1746. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2267.
- 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.
- Nightingale, T.; Cutler, D. (2013): The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11 Suppl 1, S. 192–201. DOI: 10.1111/jth.12225.
- Patzke, Juergen; Budde, Ulrich; Huber, Andreas; Méndez, Adriana; Muth, Heidrun; Obser, Tobias et al. (2014): Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIb binding in the absence of ristocetin. In: *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 25 (8), S. 860–870. DOI: 10.1097/MBC.000000000000169.
- Rayes, J.; Hommais, A.; Legendre, P.; Tout, H.; Veyradier, A.; Obert, B. et al. (2007): Effect of von Willebrand disease type 2B and type 2M mutations on the susceptibility

of von Willebrand factor to ADAMTS-13. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 (2), S. 321–328. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02296.x.

Rayes, Julie; Hollestelle, Martine J.; Legendre, Paulette; Marx, Isabelle; Groot, Philip G. de; Christophe, Olivier D. et al. (2010): Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. In: *Blood* 115 (23), S. 4870–4877. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254193.

Rieger, Manfred; Ferrari, Silvia; Kremer Hovinga, Johanna A.; 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: *Thrombosis and haemostasis* 95 (2), S. 212–220. DOI: 10.1160/TH05-08-0550.

Sabih, Ayan; Babiker, Hani M. (2018): StatPearls. Von Willebrand Disease. Treasure Island (FL).

Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (Hg.) (2011): *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schneider, M. F., Schneider, S. W. (Hg.) (2008): *Der von Willebrand-Faktor: ein intelligenter Gefäßkleber*: BIOSpektrum.

Schneppenheim, R.; Budde, U. (2008): Von-Willebrand- und Upshaw-Schulman-Syndrom. In: *medgen* 20 (2), S. 197–203. DOI: 10.1007/s11825-008-0106-y.

Slobodianuk, T. L.; Kochelek, C.; Foeckler, J.; Kalloway, S.; Weiler, H.; Flood, V. H. (2019): Defective collagen binding and increased bleeding in a murine model of von Willebrand disease affecting collagen IV binding. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17 (1), S. 63–71. DOI: 10.1111/jth.14341.

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.

Titani, K.; Kumar, S.; Takio, K.; Ericsson, L. H.; Wade, R. D.; Ashida, K. et al. (1986): Amino acid sequence of human von Willebrand factor. In: *Biochemistry* 25 (11), S. 3171–3184.

Tomokiyo, Kazuhiko; Kamikubo, Yuichi; Hanada, Takako; Araki, Tatsuya; Nakatomi, Yasushi; Ogata, Yoichi et al. (2005): Von Willebrand factor accelerates platelet adhe-

sion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. In: *Blood* 105 (3), S. 1078–1084. DOI: 10.1182/blood-2004-05-1827.

Vázquez, Beatriz Y. Salazar (2012): Blood pressure and blood viscosity are not correlated in normal healthy subjects. In: *Vascular health and risk management* 8, S. 1–6. DOI: 10.2147/VHRM.S27415.

Vischer, U. M.; Wollheim, C. B. (1997): Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent signaling in exocytosis. In: *Thrombosis and haemostasis* 77 (6), S. 1182–1188.

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.

Weibel, E. R. (1964): NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. In: *The Journal of Cell Biology* 23 (1), S. 101–112. DOI: 10.1083/jcb.23.1.101.

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.

**XIV. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit 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 07.04.2019

---

Unterschrift des Verfassers