

**Ein neuartiges Verfahren für den Nachweis der Von Willebrand Faktor-
spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 und dessen klinische
Anwendung bei Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer
Purpura (TTP) und bei Patienten mit anderen Erkrankungen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Martina Böhm
aus Meschede

Frankfurt am Main 2004
(DF1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Heinz Osiewacz

Gutachter: Herr Prof. Dr. Roland Prinzinger
Frau Prof. Dr. Inge Scharrer

Datum der Disputation: 03.09.04

Alle Dinge sind rastlos tätig, kein Mensch kann alles ausdrücken, nie wird ein Auge satt, wenn es beobachtet, nie wird ein Ohr vom Hören voll.

Die Bibel: Kohelet 1,8

1. Einleitung.....	4
1.1. Zielsetzung.....	4
1.2. Der Von Willebrand Faktor und die Hämostase.....	5
1.2.1. Die Synthese und Struktur des Von Willebrand Faktors.....	5
1.2.2. Die Funktion des Von Willebrand Faktor.....	7
1.2.3. Das Von Willebrand Syndrom.....	7
1.3. Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP).....	8
1.3.1. Entdeckungsgeschichte der TTP-Pathophysiologie.....	9
1.3.2. Differentialdiagnose zwischen TTP und anderen mikroangiopathischen, hämolytischen Anämien.....	11
1.3.3. Therapie der TTP.....	12
1.4. Die VWF-spaltende Protease (ADAMTS-13).....	14
1.4.1. VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13.....	15
1.4.2. Molekularbiologische Charakterisierung der VWF-spaltenden Protease.....	17
1.4.3. ADAMTS-13 und der VWF-Metabolismus.....	18
1.4.4. ADAMTS-13, TTP und andere Erkrankungen.....	20
1.5. Methoden zur Bestimmung der VWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS-13.....	23
1.5.1. SDS-Agarose-Gelelektrophorese nach Furlan et al. [1996].....	23
1.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Tsai [1996].....	23
1.5.3. Kollagenbindungstest nach Gerritsen et al. [1999].....	24
1.5.4. Zwei-seitiger ELISA mit monoklonalen Antikörpern nach Obert et al. [1999].....	24
1.5.5. Erniedrigung der endogenen VWF:CB bzw. des endogenen Multimeren- musters nach Aronson et al. [2001] und Krizek und Rick [2002].....	25
1.5.5. ELISA mit monoklonalem Antikörper nach He et al. [2001].....	25
1.5.6. Synthetische und rekombinante Substrate.....	25
1.5.7. Ausblick auf alternative Verfahren zur ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung...26	
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Blutentnahme und –verarbeitung.....	27
2.2. Normalkollektive.....	27
2.2.1. Normalkollektiv I.....	27

2.2.2.	Normalkollektiv II.....	28
2.2.3.	Normalkollektiv III.....	29
2.3.	Patientenkollektive.....	29
2.3.1.	Patienten mit TTP.....	29
2.3.2.	Patienten mit diversen hämatologischen Erkrankungen.....	32
2.3.3.	Patienten mit malignen Erkrankungen.....	33
2.3.4.	Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen.....	35
2.4.	Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mit der Immunoblotting-Methode.....	36
2.5.	Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mit der RCo-Methode.....	39
2.6.	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13.....	45
2.7.	Bestimmung des VWF:Antigens.....	46
2.8.	Molekulargenetische Methoden.....	48
2.9.	Erhebung sonstiger Daten.....	49
2.10.	Statistische Methoden.....	49
3.	Ergebnisse.....	51
3.1.	Ergebnisse zur Methodik.....	51
3.1.1.	Immunoblotting-Methode.....	51
3.1.2.	VWF:RCo-Methode.....	54
3.1.3.	Vergleich zwischen der Immunoblotting und der RCo-Methode.....	61
3.1.4.	Internationale Multicenterstudie.....	62
3.2.	ADAMTS-13 und TTP.....	65
3.2.1.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit TTP.....	65
3.2.2.	Inhibitoren gegen ADAMTS-13 bei Patienten mit TTP.....	66
3.2.3.	Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter während der Plasmapherese-Therapie.....	67
3.2.4.	Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter in Remission bei Patienten mit schwerem ADAMTS-13 Mangel nach PP-Therapie.....	77
3.3.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen.....	81

3.4.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen.....	84
3.5.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen.....	89
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Diskussion zur Methodik.....	95
4.2.	ADAMTS-13 und TTP.....	105
4.2.1.	Sensitivität und Spezifität des schweren ADAMTS-13-Mangels für die TTP...105	
4.2.2.	Zusammenhang zwischen der ADAMTS-13-Aktivität in Remission und der Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit TTP.....	112
4.2.3.	Inhibitoren gegen ADAMTS-13.....	114
4.2.4.	Wirkung der Plasmapherese-Therapie auf die ADAMTS-13-Aktivität und den Inhibitortiter.....	117
4.2.5.	Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter in Remission.....	120
4.3.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen.....	124
4.4.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen.....	126
4.5.	ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen.....	130
5.	Zusammenfassung.....	134
6.	Literatur.....	136
7.	Abkürzungen.....	151
8.	Anhang.....	152
8.1.	Danksagung.....	152
8.2.	Publikationen.....	153
8.2.1.	Publikationen im Rahmen der vorliegenden Dissertation.....	153
8.2.2.	Weitere Publikationen.....	154
8.3.	Lebenslauf.....	155

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Von Willebrand Faktor Metabolismus bei der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP). Die TTP ist ein seltenes, aber schweres, heterogenes, klinisches Syndrom, bei welchem es zu einer generalisierten Mikrothrombosierung in den arteriellen Kapillaren, insbesondere im Gehirn, kommt. Dies führt zu einer vorübergehenden oder dauerhaften Dysfunktion der betreffenden Gewebe, die unbehandelt in 90% der Fälle den Tod zur Folge hat. 1998 wurde erstmalig eine Assoziation zwischen erniedrigter Aktivität der neu beschriebenen Von Willebrand Faktor (VWF)-spaltenden Protease und TTP gefunden [Furlan et al. 1998; Tsai und Lian 1998]. Diese Beobachtungen führten im Jahr 2000 zum Beginn der vorliegenden Arbeit mit den folgenden Zielen:

1. Aufbau der herkömmlichen Immunoblotting Methode zur Bestimmung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität.
2. Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität, die eine zuverlässige und reproduzierbare Quantifizierung der Enzymaktivität erlaubt und weniger Zeit, Expertise und Laborausüstung benötigt als das herkömmliche Verfahren.
3. Anwendung der aufgebauten Methoden für die Diagnose und Therapieüberwachung bei Patienten mit TTP.
4. Untersuchungen zur Bedeutung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität in der TTP-Pathogenese, indem die Enzymaktivität während akuter Episoden und in Remission analysiert wird.
5. Durchführung von Studien zum Einfluss der VWF-spaltenden Proteaseaktivität bei anderen Erkrankungen (z.B. bei Patienten mit verschiedenen hämolytischen und/oder thrombozytopenen Erkrankungen, Tumorerkrankungen, thromboembolischen Erkrankungen).

Ein Jahr nach Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die VWF-spaltende Protease als ein neues Mitglied der ADAMTS (**a** disintegrin **and metallo**protease with thrombospondin motifs)-Familie identifiziert und als ADAMTS-13 bezeichnet [Levy et al. 2001; Gerritsen et al. 2001; Fujikawa et al. 2001].

In den nun folgenden Kapiteln der Einleitung wird zunächst die Funktion des Von Willebrand Faktors in der Hämostase dargestellt (Kap. 1.2.). Im Kapitel 1.3. wird die thrombotisch thrombozytopenische Purpura erläutert. Das Kapitel 1.4. widmet sich der VWF-spaltenden Protease, welche im folgenden lediglich als ADAMTS-13 bezeichnet wird. Im letzten Kapitel der Einleitung (Kap1.5.) werden schließlich die gegenwärtigen Methoden zur Bestimmung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 erläutert.

1.2. Der Von Willebrand Faktor und die Hämostase

Die Hämostase beschreibt das komplexe Zusammenspiel von Geweben, Zellen und löslichen Substanzen, welches zum einen die Fließfähigkeit des Blutes und zum anderen die Gerinnbarkeit des Blutes nach Verletzung gewährleistet. Die Blutstillung wird vereinfacht in primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. Unter primärer Hämostase versteht man das sofortige Abdichten der Verletzungsstelle des Gefäßes durch Vasokonstriktion und Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die sekundäre Hämostase beschreibt die Aktivierung der Fibrinbildung durch plasmatische Gerinnungsfaktoren. Das Schema der primären und sekundären Hämostase beschreibt die in vivo Verhältnisse jedoch nur sehr unzureichend, da die Blutgerinnung weniger eine Aneinanderreihung verschiedener Reaktionen als vielmehr eine Netzwerk komplexer, ineinandergreifender Ereignisse darstellt.

Der Von Willebrand Faktor (VWF) ist ein zentrales Protein der sogenannten primären wie auch der sekundären Hämostase. Im Jahr 1926 beschrieb E.A. Von Willebrand [Von Willebrand 1926] erstmalig eine bis dahin unbekannt Form der angeborenen hämorrhagischen Diathese mit verlängerten Blutungszeiten bei normalen Thrombozytenzahlen. Anfang der siebziger Jahre wurde das verantwortliche Plasmaprotein identifiziert und als Von Willebrand Faktor (VWF) bezeichnet. Die hämorrhagische Diathese, welche durch einen VWF-Mangel ausgelöst wird, wurde dementsprechend als Von Willebrand Syndrom (VWS) bezeichnet. Im Folgenden wird die Synthese, Struktur und Funktion des VWF-Moleküls (Kap. 1.2.1.-1.2.2.) zusammenfassend dargestellt. Im Kapitel 1.2.3. wird das Von Willebrand Syndrom kurz erläutert.

1.2.1 Die Synthese und Struktur des Von Willebrand Faktors

Die Synthese des VWF-Moleküls erfolgt ausschließlich in Endothelzellen und Megakaryozyten. Das primäre Translationsprodukt (Abb. 1) umfasst ein Signalpeptid (22 AS), Propeptid (791 AS) und das eigentliche VWF Polypeptid (2050 AS).

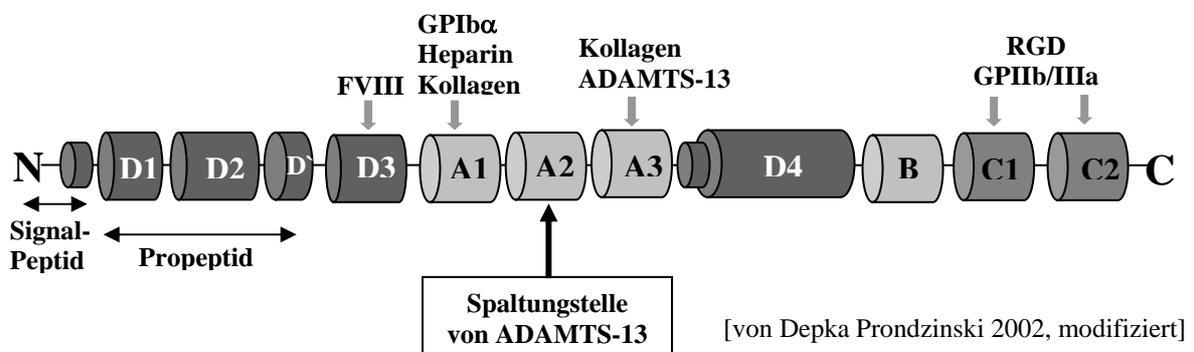


Abbildung 1: Schematische Struktur des Von Willebrand Faktors

Oberhalb der Domänen sind die jeweiligen Liganden dargestellt. Die für Adhäsivproteine typische RGD Sequenz befindet sich am C-terminalem Ende des Monomers. Unterhalb der Domänen ist die Spaltungsstelle von ADAMTS-13 (Kap. 1.4.) gekennzeichnet.

Im endoplasmatischem Retikulum erfolgt die Bildung von Pro-VWF-Dimeren durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den C-terminalen Enden zweier Pro-VWF Peptide (tail-to-tail Konfiguration, Abb. 2). Nach dem Transport der Dimere in den Golgiapparat werden diese glykolisiert und durch Ausbildung von Disulfidbrücken an den N-terminalen Enden (head-to-head Konfiguration) polymerisiert (Abb. 2). Dadurch entstehen unterschiedlich große Polymere gleicher Untereinheiten, die sogenannten VWF-Multimere. Das Propeptid dient dabei wahrscheinlich als Disulfid-Isomerase, es wird nach abgeschlossener Multimerisierung proteolytisch abgespalten und gemeinsam mit dem reifen VWF in das Plasma sezerniert. Der multimerisierte VWF enthält bis zu 40 Untereinheiten (>20000kDa) und ist damit ein ungewöhnlich großes Plasmaprotein.

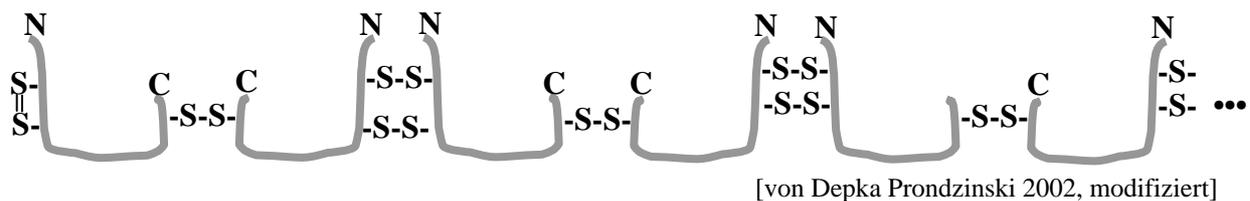


Abbildung 2: Polymerisation der Von Willebrand Faktor Monomere

Die Pro-VWF-Dimere werden nach Glykolisierung durch Ausbildung von Disulfidbrücken an den N-terminalen Enden (head-to-head Konfiguration) in unterschiedlich große Multimere polymerisiert.

Der in den Endothelzellen produzierte VWF wird konstitutiv abluminal in die Extrazellulärmatrix und luminal in das Plasma freigesetzt. Der VWF wird zudem in speziellen Organellen der Endothelzellen, den Weibel-Palade Bodies gespeichert. Die Freisetzung aus diesen Kompartimenten erfolgt nach Stimulierung der Endothelzelle durch Verletzung oder durch Plasmafaktoren wie Thrombin, Fibrin, Adrenalin, Histamin oder Komplementfaktor 5b-9 [Pimanda und Hogg 2002]. In Thrombozyten wird der VWF in den α -Granula gespeichert und bei Aktivierung der Thrombozyten durch Kontakt mit Fremdoberflächen oder Agonisten wie Kollagen, Thrombin, ADP, Adrenalin freigesetzt [Hiller und Riess 1998].

Elektronenmikroskopische Analysen des VWF-Moleküls zeigen, dass die VWF-Multimere im Plasma in kompakter, globulärer Form vorliegen und erst nach Bindung an subendotheliale Strukturen oder unter Einwirkung hoher Scherkräfte entfaltet werden [Siedlecki et al. 1996]. Bei dieser Entfaltung des Von Willebrand Faktors kommt es zu einer Verlagerung der Bindungsepitope für Kollagen und Thrombozytenrezeptoren an die Proteinoberfläche, so dass die Rezeptoren für die entsprechenden Liganden zugänglich werden. Die Domänen des reifen VWF mit den entsprechenden Epitopen der wichtigsten Liganden ist in Abbildung 1 dargestellt. Für weitere Informationen über Struktur und Synthese des VWF sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen [Furlan 1996; Budde und Pötzsch 1998; Ruggeri 1999; Pimanda und Hoog 2002].

1.2.2. Die Funktion des Von Willebrand Faktors

Der VWF ist wesentlich bei der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten beteiligt, indem er die Bindung der Thrombozyten untereinander und an subendotheliale Strukturen vermittelt. Der VWF besitzt dazu Bindungs epitope für das Glykoprotein (GP) Ib α des thrombozytären GPIb-IX-Komplexes und für Kollagen (Abb. 1). In Gegenwart von Thrombin oder/und ADP bindet der VWF zudem an den Thrombozytenrezeptor GP IIb/IIIa (Abb. 1). Das Ausmaß der VWF vermittelten Adhäsion bzw. Aggregation der Thrombozyten korreliert mit der Größe der VWF-Multimere. Durch die vielfache Wiederholung der identischen Untereinheiten in den hochmolekularen VWF-Multimeren (Abb. 2) wird die Anzahl der benachbarten Bindungs epitope erhöht, was eine stabile Bindung der Thrombozyten aneinander und an das Kollagen der subendothelialen Matrix gewährleistet.

Der VWF ist zudem am Metabolismus von Gerinnungsfaktor VIII beteiligt und trägt demnach auch wichtige Funktionen in der plasmatischen Gerinnung. FVIII ist im Plasma nahezu vollständig an den VWF gebunden. Die nicht kovalente Bindung zwischen dem N-terminalen Bereich der leichten Kette von FVIII und der D3-Domäne des VWF-Moleküls (Abb. 1) schützt den FVIII vor einem vorzeitigen, proteolytischem Abbau und erhöht somit seine Halbwertszeit. Die Aktivierung von FVIII durch Thrombin oder aktivierten Faktor X führt zu einer schnellen Dissoziation des Komplexes. Forschungsergebnisse am Zellkulturmodell zeigen außerdem, dass der VWF die Sezernierung von FVIII fördern kann und somit die Konzentration von FVIII im Plasma zusätzlich beeinflussen könnte. Die Akkumulation des VWF-Moleküls an Orten der Verletzung resultiert theoretisch auch in einer Akkumulation von FVIII. Die physiologische Bedeutung dieser VWF vermittelten Anreicherung von FVIII für die ausreichende Thrombinbildung ist allerdings noch unklar. Für weitere Informationen über die Funktion des Von Willebrand Faktors sei wiederum auf einschlägige Literatur verwiesen [Furlan 1996; Budde und Pötzsch 1998; Ruggeri 1999; Ginsburg 1999; von Depka Prondzinski 2002; de Groot 2002; Ruggeri 2003].

1.2.3. Das Von Willebrand Syndrom

Der qualitative und/oder quantitative Mangel an VWF im Plasma führen zum Von Willebrand Syndrom (VWS), der häufigsten, angeborenen Blutungsneigung mit einer Prävalenz von 1:1000 [von Depka Prondzinski 2002]. Die typischen Symptome des Von Willebrand Syndroms sind Epistaxis, Hämatomneigung, Hypermenorrhoe, Zahnfleischbluten, gastrointestinale Blutungen und posttraumatische, postpartale und postoperative Blutungen [von Depka Prondzinski 2002].

Bei der quantitativen Synthesestörung unterscheidet man zwischen Patienten mit einer erniedrigten, aber deutlich messbaren Konzentration an VWF im Plasma (Typ1) und Patienten, bei welchen der VWF im Plasma nicht mehr nachweisbar ist (Typ 3). Das VWS, Typ 2 umfasst verschiedene quantitative Abnormitäten des VWF-Moleküls und besteht aus

mehreren Subtypen (Typ 2 A,B, M, N) [Sadler 1994; Sadler und Gralnick 1994; Favaloro 1999; Ginsburg 1999; Budde et al. 2002]. Für die Diagnostik des Von Willebrand Syndroms empfiehlt sich zunächst eine sorgfältige Anamnese, die Bestimmung der in vitro und in vivo-Blutungszeit und der partiellen Thromboplastinzeit (PTT). Die erweiterte Diagnostik umfasst die Bestimmung des VWF Antigens (VWF:Ag), der Ristocetin-Kofaktoraktivität des VWF-Moleküls (VWF:RCo) sowie der FVIII Aktivität (FVIII:C). Für die spezielle Diagnostik zur Typisierung des Von Willebrand Syndroms werden folgenden Tests durchgeführt: Kollagenbindungsaktivität (VWF:CB), FVIII-Bindungsaktivität (VWF:FVIII-B), Multimerenanalyse, Ristocetin-induzierte Aggregation (RIPA), VWF-Gehalt in den Thrombozyten und ggf. die VWF Genanalyse [Favaloro 1999; Budde et al. 2002].

1.3. Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura

Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) ist ein schweres, heterogenes, klinisches Syndrom, welches durch Thrombozytopenie, mikroangiopathische Coombs-negative hämolytische Anämie, neurologische Störungen, Nierenfunktionsstörungen und Fieber charakterisiert ist. Allerdings zeigen nur 40% aller Patienten dieses klassische Symptom-Pentad, wohingegen die drei erstgenannten Symptome bei 75% aller Patienten beobachtet werden [Rock et al. 2000].

Die **Thrombozytopenie** entsteht durch einen erhöhten peripheren Thrombozytenumsatz aufgrund einer disseminierten, intravaskulären VWF-vermittelten Plättchenaggregation in der Mikrozirkulation. Diese Plättchenaggregation führt zur Mikrothrombosierung und damit zur Ischämie in den betreffenden Geweben, insbesondere im Gehirn, Niere und Herz. Die resultierende Thrombozytopenie führt auf der anderen Seite zur hämorrhagischen Diathese mit Auftreten von Petechien, Hämaturie, Hämatomen, Epistaxis und seltener Gehirnblutungen und retroperitonealen Blutungen. Durch hohe Scherkräfte (laminare Schubspannung des fließenden Blutes) an Orten der Mikrothrombosierung kommt es zu einer mechanischen Zerstörung von Erythrozyten und damit zu einer **mikroangiopathischen, Coombs-negativen, hämolytischen Anämie**. Die Mikrothrombosierung in den zerebralen Gefäßen führt zu den typischen, fluktuierenden, **neurologischen Symptomen** wie Kopfschmerz, Aphasie, Paresen, Bewusstseinstörungen, Krampfanfällen und Koma. Fieber und Abgeschlagenheit als Ausdruck der Anämie sind unspezifische Begleitsymptome der TTP.

Bei 50% aller Patienten kommt es zu einer leichten Erhöhung des Serumkreatinins, eine schweres Nierenversagen beobachtet man allerdings nur in 8-12% aller Fälle [Eknovan und Riggs 1986].

Die Prävalenz der TTP beträgt ca. 1:1000000 [Ridolfi und Bell 1981]. Die Mortalität der TTP konnte durch die derzeit gültigen Therapieregime (Kap. 1.3.3.) von 90% auf 10-30% gesenkt werden [Rock et al. 2000; Chemnitz et al. 2001b]. Die Erkrankung tritt zumeist

idiopathisch im Erwachsenenalter auf, wobei Frauen häufiger als Männer betroffen sind (Verhältnis Frauen:Männer beträgt ca. 2:1) [Allford und Machin 2000]. 10-40% der Patienten erleiden ein oder mehrere Rezidive [Allford und Machin 2000]. Die Erstmanifestation der weitaus selteneren, familiären TTP liegt demgegenüber im frühen Kindes- oder Jugendalter und ist zumeist durch häufig wiederkehrende Episoden von Hämolyse und Thrombozytopenie gekennzeichnet.

Ätiologie und Pathogenese der TTP war bis zu den 80er Jahren völlig ungeklärt. Im folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse, die zur Aufklärung der TTP-Pathophysiologie führten dargestellt (Kap. 1.3.1.). Im Kapitel 1.3.2. wird die Differentialdiagnose zwischen TTP und anderen mikroangiopathischen Anämien kurz erläutert. Im Kapitel 1.3.3 werden die aktuellen Therapieoptionen für die TTP aufgeführt. Im Kapitel 1.4. wird schließlich das Schlüsselenzym der TTP, die VWF-spaltende Protease (ADAMTS-13) vorgestellt.

1.3.1. Entdeckungsgeschichte der TTP-Pathophysiologie

1924:

Moschcowitz beschrieb erstmalig ein bislang unbekanntes Krankheitsbild bei einer 16jährigen Patienten mit Anämie, Petechien, Fieber, Proteinurie und Lähmungserscheinungen. Bei Autopsie der Patientin fand Moschcowitz Fibrin-arme Thromben mit einem hohen Gehalt an VWF (hyaline Thromben) in den terminalen Arteriolen und Kapillaren von Herz und Niere [Moschcowitz 1924]. Die TTP wird nach ihrem Entdecker gelegentlich auch als Moschcowitz-Syndrom bezeichnet.

1982:

Moake et al. [1982] fanden ultralange VWF-Multimere (Abb. 3) bei TTP-Patienten in Remission und entdecken damit den Zusammenhang zwischen VWF Metabolismus und TTP.

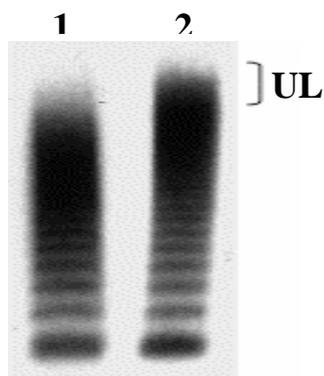


Abbildung 3:

Beispielhafte Darstellung von Ultralangen VWF-Multimeren (UL) in Spalte 2 gegenüber Normalplasma in Spalte 1

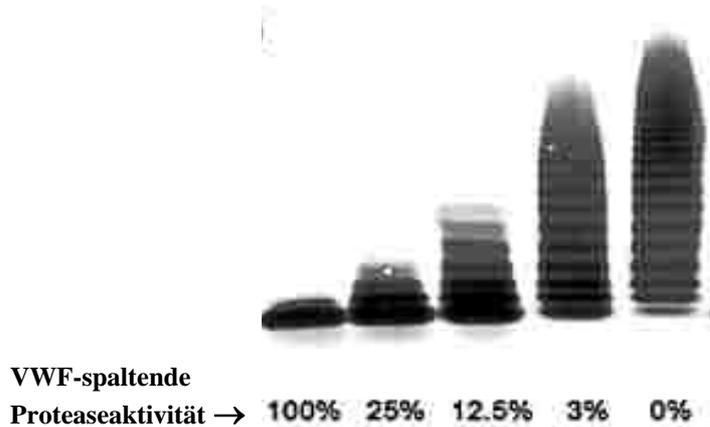
[Tsai et al. 2003]

1986:

Zimmerman et al. [1986] zeigten erstmalig, dass der VWF im Plasma proteolytisch in 140 und 176 kDa-Fragmente gespalten wird.

1996:

Furlan et al. [1996] und Tsai [1996] konnten zeitgleich eine Metalloprotease aus humanem Plasma identifizieren, welche den VWF in vivo und in vitro zwischen Tyr1605 und Met1606 spaltet und als VWF-spaltende Protease bezeichnet wurde. Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft den in vitro Nachweis der VWF-spaltenden Proteaseaktivität durch das von Furlan et al [1996] und Tsai [1996] entwickelte Immunoblotting-Verfahren (Kap. 1.5.1.).

**Abbildung 4:**

Proteolyse der VWF Multimere durch die VWF-spaltende Metalloprotease, hier dargestellt durch SDS-AGE und anschließendem Immunoblotting

[Bianchi et al. 2002a]

1998:

Furlan et al. [1998] und Tsai und Lian [1998] konnten unabhängig voneinander nachweisen, dass Patienten mit akuter TTP einen schweren Mangel an der VWF-spaltenden Proteaseaktivität zeigten, welcher für die von Moake et al. [1982] gefundenen ultralangen VWF-Multimere verantwortlich sein könnte. Furlan et al. [1998] und Tsai und Lian [1998] konnten bei vielen Patienten mit einer nicht-familiären TTP inhibierende IgG-Autoantikörper gegen die VWF-spaltende Protease nachweisen.

2001:

Levy et al. [2001] konnten durch eine Genome-wide-linkage-Analyse mit Mikrosatellitenmarkern bei vier Familien mit angeborener TTP das für die Erkrankung verantwortliche Gen lokalisieren. Das Gen codiert ein neues Mitglied der ADAMTS (**a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs**)-Familie, welches als ADAMTS-13 bezeichnet wurde (Abb. 5). Gerritsen et al. [2001] und Fujikawa et al. [2001] reinigten und sequenzierten die VWF-spaltende Protease und konnten auf diesem Wege den Beweis erbringen, dass es sich bei ADAMTS-13 um die VWF-spaltende Protease handelt.

2002/2003:

Verschiedene Arbeitsgruppen identifizierten zahlreiche, weitere Mutationen in ADAMTS13 bei Patienten mit TTP [Kokame et al. 2002; Schneppenheim et al. 2003b, Savasan et al. 2003; Antoine et al. 2003, Assink et al. 2003; Bestetti et al. 2003].

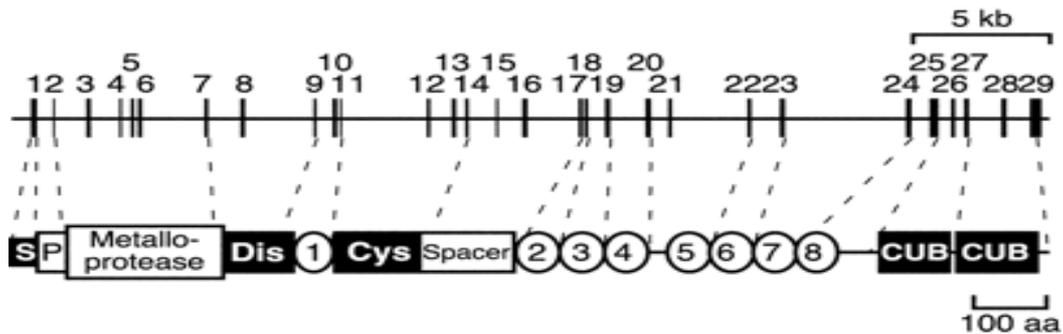


Abbildung 5: Schematische Struktur von ADAMTS-13

Erklärungen siehe Kap. 1.4.2. [Zheng et al. 2001a]

1.3.2. Differentialdiagnose zwischen TTP und anderen mikroangiopathischen, hämolytischen Anämien

Als **mikroangiopathische hämolytische Anämie (MAHA)** bezeichnet man eine Anämie, die durch Zerstörung von Erythrozyten (Nachweis von Erythrozyten-Fragmenten im peripheren Blutausschlag) bei negativem Coombs-Test verursacht wird [George 2000]. Unter den mikroangiopathischen hämolytischen Anämien ist die TTP differentialdiagnostisch vor allem von dem **hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)** abzugrenzen [Moake 2002a].

Das HUS ist ebenfalls eine MAHA mit Thrombozytopenie und einer Mikrothrombosierung. Diese Mikrothrombosierung betrifft beim HUS allerdings vor allem die Glomerula. Aus diesem Grund steht beim HUS die initial stärker ausgeprägte Niereninsuffizienz und weniger die neurologische Symptomatik im Vordergrund. Die beiden Syndrome lassen sich jedoch klinisch nicht immer scharf voneinander abgrenzen und werden aus diesem Grund gelegentlich als TTP/HUS zusammengefasst [George 2000; Vesely et al. 2003]. Pathophysiologisch handelt es sich, neuesten Erkenntnissen zur Folge, allerdings um zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten. Das seltene, familiäre HUS wird durch einen Mangel an Komplementfaktor H verursacht [Warwicker et al. 1998], während das erworbene HUS meist Folge einer Infektion mit Verotoxin-bildenden E.coli Bakterien (O1257:H7) mit typischer, blutiger Diarrhoe ist [Karmali et al. 1985]. Morphologisch zeigen die Mikrothromben beim HUS als Folge einer gesteigerten Thrombinbildung und Inhibierung der Fibrinolyse [Chandler et al. 2002] Fibrinfäden [Moake 2002a; Hosler et al. 2003], während die Thromben bei der TTP sehr fibrinarm sind und reich an Thrombozyten und VWF sind [Asada und Sumiyoshi 1992; Hosler et al. 2003].

Die TTP ist zudem vom HELLP (**hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets**)-Syndrom [Gerth et al. 2002] und weiteren sekundären, hämolytischen Mikroangiopathien (z.B. bei HIV, Neoplasien, oder nach Knochenmarkstransplantationen) oder medikamentös bedingten Mikroangiopathien nach Therapie mit MitomycinC, CyclosporinA, FK506, Quinine [Cines et al. 2000] oder nach Bupropion-Gabe [Mele et al. 2003] zu differenzieren.

1.3.3. Therapie der TTP

Plasmatherapie:

Rubenstein et al. [1959] berichteten 1959 erstmalig über die erfolgreiche Behandlung einer TTP-Patientin durch Austausch von Vollblut. Byrnes und Khurana [1977] belegten 18 Jahre später in einer größeren Studie, dass TTP durch den Plasma-Austausch oder die alleinige Plasmainfusion sehr effektiv behandelt werden kann. Die allgemeine Einführung der Plasmatherapie, insbesondere in Kombination mit der Plasmapherese, und die modernen, supportiven Möglichkeiten der Intensivmedizin konnte die Letalität der TTP von 90% [Amorosi und Ullmann 1966] auf 10-30% senken [Rock et al. 2000; Chemnitz et al. 2001b].

Die Canadian Apheresis Group konnte 1991 in einer großen, retrospektiven Studie nachweisen, dass die Plasmapherese in der TTP-Therapie effektiver ist als die alleinige Plasmainfusion [Rock et al. 1991]. 49% der Patienten zeigten unter Plasmapheresetherapie eine Response nach 7 Tagen, während bei den Patienten, die mit Plasmainfusion behandelt wurden nur 25% eine Response nach 7 Tagen zeigten [Rock et al. 1991]. Man vermutete lange, dass die Plasmapherese ein toxisches, Endothel-schädigendes Agens und/oder Thrombozyten-Aggregations-fördernden Faktor entfernt [Moake 1992; Byrnes und Khurana 1977; Byrnes und Lian 1979]. Die Plasmatherapie blieb jedoch bis zur Aufklärung der TTP-Pathogenese in den letzten Jahren (Kap. 1.3.3. und Kap. 1.4.) eine äußerst wirkungsvolle aber empirische Therapie. Heute vermutet man, dass der Plasma-Austausch die Aktivität der VWF-spaltenden Protease rekonstituiert, indem auf der einen Seite die Protease durch die Gabe von „fresh frozen plasma“ (FFP) substituiert wird und auf der anderen Seite neutralisierende Auto-Antikörper entfernt werden. Der eindeutige Beweis für eine therapeutisch wirksame Entfernung der Auto-Antikörper durch die Plasmapherese wurde allerdings bislang noch nicht erbracht.

Die seltene Form der hereditären TTP wird im Gegensatz zur erworbenen Form sehr effektiv mit der alleinigen Plasmainfusion behandelt [Häberle et al. 1999; Allford et al. 2000; Te Loo et al. 2000; Barbot et al. 2001; Biecker et al. 2001; Furlan and Lämmle 2001]. Chronisch rezidivierende TTP-Episoden können bei diesen Patienten durch prophylaktische Plasma-Gabe alle 2-4 Wochen vermieden werden [Häberle et al. 1999; Te Loo et al. 2000; Barbot et al. 2001].

Für die erworbene TTP stehen neben der Plasmatherapie weitere Therapieoptionen (Corticosteroide, Vincristin®, Splenektomie, Immunadsorption, Rituximab) zur Verfügung die im folgenden kurz erörtert werden.

Corticosteroide:

Nachdem Bell et al. [1991] in einer großen Studie mit 108 Patienten die therapeutische Wirksamkeit der Corticosteroid-Therapie nachweisen konnten, umfasst das Therapieregime

neben der Plasmapherese immer die Gabe von Corticosteroiden. Die immunsuppressive Wirkung der Corticosteroide beruht vor allem auf einer Erniedrigung der Transkriptionsrate verschiedener Cytokine. Es kommt im Besonderen zur verminderten Synthese von Interleukin-2, welches eine Aktivierung der T-Lymphocyten blockiert (Verschlechterung der Antigenpresentation) [Kaefer und Resch 2001]. Der Nachweis von autoimmunologischen Prozessen bei der erworbenen TTP (Kap. 1.3.1.) lieferte eine Rationale für die Therapie mit Corticosteroiden. Bislang konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, dass die Corticosteroid-Gabe tatsächlich eine Synthese-Hemmung der TTP-spezifischen Auto-Antikörper induziert.

Vincristin®:

Bei Patienten mit verzögerter Response auf Plasma-Austausch wurde eine zusätzliche Therapie mit Vincristin® vorgeschlagen [Moake 1992]. Obwohl prospektive und randomisierte Studien über die therapeutische Wirksamkeit dieser invasiven Chemotherapie fehlen, häufen sich in der Literatur die Berichte über den erfolgreichen Einsatz von Vincristin® [Guttermann 1992; Bobbio-Pallavicini et al. 1994; Van Gool et al. 1994; Mazzel et al. 1998; Schulz et al. 1999; Ferrara et al. 2002]. Vincristin® depolymerisiert Mikrotubuli der Thrombocyten und verändert damit wahrscheinlich die Exposition von GPIIb/IIIa und GPIIb-IIIa Rezeptoren, was wiederum die VWF vermittelte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation hemmt [Guttermann 1992; Moake 2002b]. Vincristin® hat zudem eine immunsuppressive Wirkung, da unspezifisch auch Mikrotubuli zerstört werden, welche für Mitose und Zellteilung notwendig sind [Guttermann 1992].

Splenektomie:

Die Splenektomie ist eine Therapieoption für therapierefraktäre oder chronisch rezidivierende Patienten. In der Mehrzahl der publizierten Fälle induzierte die Splenektomie eine konsistente klinische Remission [Cuttner 1974; Reynolds et al. 1976; Rutkow 1978; Furlan et al. 1998b; Wichmann et al. 2001; Schwartz et al. 2001; Langer et al. 2002; De la Rubia et al. 2000; Kremer et al. 2003]. Es wurden aber auch Patienten beschrieben, welche nach Splenektomie rezidivieren [De la Rubia et al. 2000; Guttermann et al. 2002; Thompson et al. 2003]. Die Splenektomie während akuter TTP-Manifestationen war oft nicht erfolgreich und erhöht unter Umständen die Mortalität [Hayward et al. 1994]. Der therapeutische Wirkungsmechanismus der Splenektomie ist völlig ungeklärt. Furlan et al. [1998b] zeigten erstmalig eine Splenektomie-assoziierte Elimination der Auto-Antikörper gegen ADAMTS-13. Dies konnte allerdings bei einer anderen Kasuistik nicht eindeutig bestätigt werden [Langer et al. 2002].

Immunadsorption:

Gaddis et al. [1997] belegten in einer retrospektiven Studie den erfolgreichen Einsatz einer Protein-A Säulen Immunadsorption bei 7 von 10 Patienten. Zwei publizierte Kasuistiken im letzten Jahr bestätigten die Effektivität der Immunadsorption und zeigten darüber hinaus eine

Therapie assoziierte Erniedrigung der IgG Auto-Antikörper gegen ADAMTS-13 [Knöbl et al. 2003a; Studt et al. 2003e].

Rituximab:

In den letzten beiden Jahren wurde Rituximab erstmalig in der TTP-Therapie eingesetzt. Rituximab ist ein chimärer Maus/Mensch monoklonaler Antikörper gegen CD20, welcher spezifisch die Anzahl der CD20-positiven B-Zellen erniedrigt und somit die Produktion von Antikörpern hemmt [Johnson und Glennie 2001]. Die Rationale für die Rituximab-Therapie ist wiederum der Nachweis von Auto-Antikörpern gegen ADAMTS-13. Von den 13 bislang publizierten Fällen [Chemnitz et al. 2002; Gutterman et al. 2002; Ahmad et al. 2002; Tsai und Shulman 2003; Zheng et al. 2003] folgte der Rituximab-Gabe bei 8/11 Patienten eine vollständige, klinische Remission, 2 Patienten zeigten eine inkomplette Response, während bei einem Patienten kein messbares Ansprechen auf Rituximab-Gabe beobachtet werden konnte. Die Kausalität zwischen Therapie und klinischer Remission ist allerdings, insbesondere aufgrund adhärenter Therapien, nicht immer eindeutig nachweisbar und wird im Kapitel 4.2.4 näher diskutiert.

Sonstige:

Für sonstige, teils sehr kontroverse Therapieoptionen (z.B. Acetylsalicylsäure, Prostacyclin), die bei der vorliegenden Arbeit nicht relevant sind, sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [Moake 1992; Rock et al. 2000; Moake 2002a+b].

In der vorliegenden Arbeit wurde die therapeutische Wirkung der Plasmapherese (Kap. 3.2.3. bzw. 4.2.3.), der Splenektomie (Kap. 3.2.4. bzw. 4.2.4.) und der Rituximab-Gabe (Kap. 3.2.4. bzw. 4.2.4.) untersucht.

1.4. Die VWF-spaltende Protease (ADAMTS-13)

Wie in Kapitel 1.3.1. gezeigt wurde, führten die Untersuchungen bei TTP Patienten zur Identifizierung eines neuen Gerinnungsfaktors: ADAMTS-13. ADAMTS-13 gehört zu der Familie der ADAMTS (**a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloprotease with **t**hrombospondin motifs)-Proteasen und ist der bislang einzig bekannte Vertreter seiner Familie, der Funktionen in der Hämostase innehat. Im Folgenden werden die neuesten Erkenntnisse über die VWF-spaltende Aktivität von ADAMTS-13 (Kap. 1.4.1.) und über Eigenschaften und Struktur der Protease zusammengefasst (Kap. 1.4.2.). Die Pathophysiologie der TTP und die allgemeine Bedeutung von ADAMTS-13 im VWF-Metabolismus wird im Kapitel 1.4.3. erläutert. Das Kapitel 1.4.4. beschäftigt sich mit der klinischen Bedeutung des ADAMTS-13-Mangels. Im Kapitel 1.5. werden schließlich die derzeitigen Methoden zur Bestimmung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 dargestellt.

1.4.1. VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13

ADAMTS-13 spaltet unter hohen Scherkräften oder in Anwesenheit von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid den VWF in vitro [Furlan et al. 1996; Tsai 1996]. Die dabei produzierten N- und C-terminalen Dimere von 200 kDa und 350 kDa entsprechen den Fragmenten des Von Willebrand Faktors im normalen Plasma [Furlan et al. 1996; Tsai 1996]. Die in vitro gemessene, enzymatische Aktivität spiegelt demnach die in vivo Proteolyse wieder. Der VWF wird spezifisch zwischen Tyrosin1605 und Methionin1606 (alte Nomenklatur Tyrosin842 – Methionin843) gespalten [Furlan et al. 1996; Tsai 1996].

Die VWF-spaltende Proteaseaktivität benötigt divalente Kationen und wird dementsprechend durch EGTA und EDTA gehemmt [Furlan et al. 1996; Tsai 1996]. Die Katalyse durch ADAMTS-13 ist abhängig von dem verwendeten Kationen, wobei Ba^{2+} die Protease in vitro effektiver als Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} aktiviert [Furlan et al. 1996]. Die in vitro Proteolyse des Von Willebrand Faktors erfolgt nicht in Puffer mit physiologischer Ionenkonzentration, sondern nur bei extrem niedrig molarem Puffer (5 mM Tris) mit einem pH Optimum von 8-9 [Furlan et al. 1996]. Die VWF-spaltende Proteaseaktivität von ADAMTS-13 erniedrigt sich konzentrationsabhängig in Gegenwart von NaCl (undedektierbare Aktivität bei 150 mM) [Furlan et al. 1996]. ADAMTS-13 wird nicht durch Serinproteaseinhibitoren, z.B. PefaBloc SC gehemmt. Es findet sich keine VWF-spaltende Aktivität im Lysat von Thrombozyten [Furlan et al. 1996].

Bislang sind neben der VWF-Proteolyse keine weiteren Funktionen von ADAMTS-13 bekannt. Die VWF-spaltende Proteaseaktivität von ADAMTS-13 wird daher im Folgenden vereinfacht als ADAMTS-13-Aktivität bezeichnet.

Dong et al. [2002] konnten kürzlich mit Hilfe der Videomikroskopie bahnbrechende Erkenntnisse über die in vivo Aktivität von ADAMTS-13 erzielen. Sie zeigten, dass durch Histamin stimulierte Endothelzellen VWF sezernieren, welcher als langgestrecktes Molekül an der Endothelzelle hängen bleibt und unter Fluß Thrombozyten bindet (Abb. 6). Nach Zugabe von normalem Plasma oder rekombinanter ADAMTS-13 verschwinden diese „beads-on-a-string“-Strukturen innerhalb weniger Sekunden. Plasmen von TTP Patienten zeigten demgegenüber keinen Effekt auf den an der Endothelzelle verankerten VWF. Die Autoren folgerten aus diesen Beobachtungen, dass der sezernierte VWF innerhalb weniger Sekunden auf der Endothelzelloberfläche von ADAMTS-13 gespalten wird. Dies ist insofern überraschend, da das Enzym in vitro Stunden braucht um den VWF messbar zu degradieren. Die Gruppe spekulierte, dass ADAMTS-13 durch seine Thrombospondin Domäne an der Endothelzelle verankert wird. Die Lokalisation von Substrat und Enzym an der Endothelzelloberfläche (Abb. 7) ermöglicht neben einer dramatischen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit die physiologische Regulierung der ADAMTS-13 katalysierten VWF-Proteolyse.

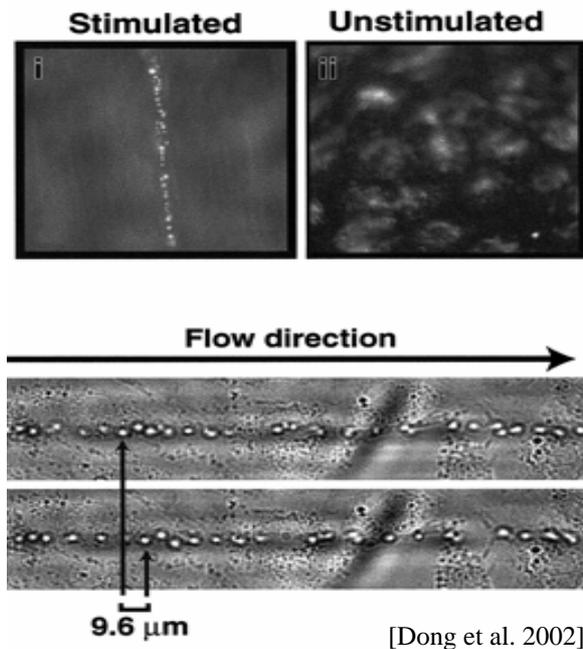


Abbildung 6: Thrombozytenadhäsion auf stimulierten Endothelzellen

Gewaschene, normale Thrombozyten fließen bei konstantem Scherkräften von $2,5 \text{ dyne/cm}^2$ über eine Glassplatte mit Histamin stimulierten HUVECs (human umbilical vein endothelial cells). Es bilden sich stabile, lange Leinen mit anhängenden Thrombozyten. Diese sogenannten beads-on-a-string-Strukturen verschwinden einige Sekunden nach Zugabe von Normalplasma oder rekombinanter ADAMTS-13. Auf nicht stimulierten Endothelzellen werden demgegenüber keine Thrombozyten gebunden.

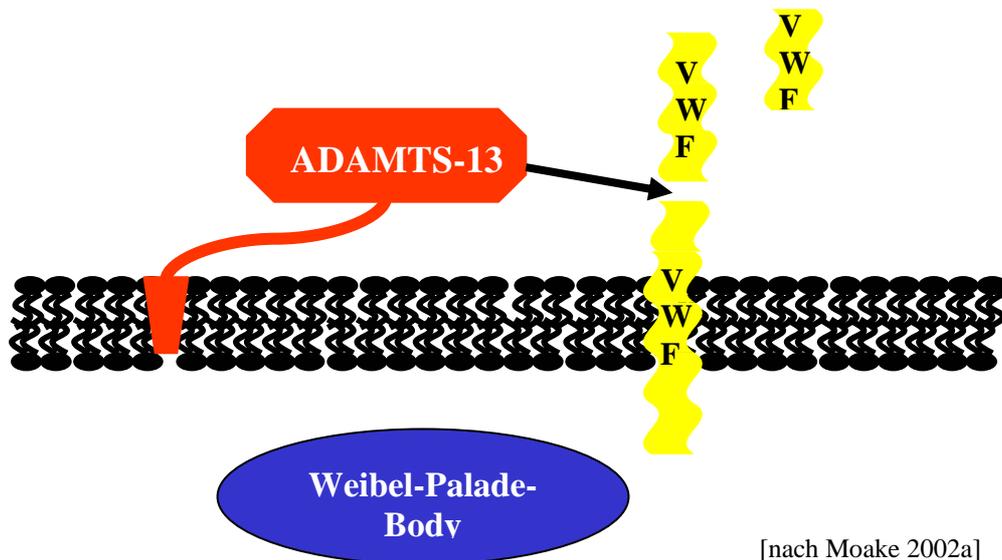


Abbildung 7: Möglicher in vivo Mechanismus der ADAMTS-13 katalysierten VWF-Proteolyse

Nach Stimulation werden UL-Multimere aus den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen freigesetzt. ADAMTS-13 spaltet den freigesetzten und verankerten VWF auf der Endothelzelloberfläche und ist dabei vermutlich an der Endothelzelle (evt. mittels einer Thrombospondindomäne) gebunden.

1.4.2. Molekularbiologische Charakterisierung der VWF-spaltenden Protease

Gerritsen et al. [2001] reinigten die VWF-spaltende Protease aus humanem Plasma durch Affinitätschromatographie mit IgG Auto-Antikörpern und einer Serie weiterer chromatographischer Methoden. Die Protease wurde als Single-Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 150 kDa identifiziert. Die Konzentration im humanen Plasma liegt bei ca. 1 µg/ml. Das Enzym zeigt in vitro eine außergewöhnlich lange Halbwertszeit von über einer Woche [Gerritsen et al. 2001]. In vivo besitzt ADAMTS-13 ebenfalls eine hohe Halbwertszeit von 2-3 Tagen [Furlan et al. 1999]. Zeitgleich mit Gerritsen et al. [2001] isolierten und sequenzierten Fujikawa et al. [2001] die VWF-spaltende Protease aus einem FVIII/VWF Konzentrat und Soejima et al. [2001] aus der Cohn Fraktion-I eines humanem Plasmapools.

Levy et al. [2001] konnten parallel zu den proteinanalytischen Verfahren mit einer Mikrosatelliten-Kopplungsanalyse in 4 Familien mit TTP das für die Erkrankung verantwortliche Gen ADAMTS13 lokalisieren. Bei der Kopplungsanalyse konnte die VWF-spaltende Proteaseaktivität als phänotypischer Marker dienen, da alle TTP Patienten einen starken Proteasemangel (2-7%) zeigten, während gesunde Familienmitglieder mit einer Erniedrigung der Proteaseaktivität auf ca. 50% phänotypisch als Träger der TTP verursachenden Mutationen identifiziert werden konnten. Das ADAMTS13-Gen befindet sich auf Chromosom 9q34, hat eine Größe von 37kb mit 29 Exons (Abb. 5). Northern-Blot-Analysen zeigten eine vollständige 4,7 kb mRNA in der Leber und eine verkürzte 2,4 kb mRNA in der Plazenta. Die Analyse mittels RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) zeigte Transkripte in Niere, Bauchspeicheldrüse, Milz, Prostata und Leukozyten, während keine Expression im Herz, Hirn, Lunge oder Skelettmuskel detektiert werden konnte [Levy et al. 2001]. Hauptsyntheseort für ADAMTS-13 ist demnach die Leber, wobei die physiologische Bedeutung der schwachen Transkription in anderen Geweben unklar ist.

Anhand der Proteinsequenzen von Gerritsen et al. [2001], Fujikawa et al. [2001] und Soejima et al. [2001] konnte gezeigt werden, dass das neu identifizierte ADAMTS13-Gen die VWF-spaltende Protease selber codiert. Die cDNA umfasst 4597 Nucleotide und codiert für ein Peptid mit 1427 Aminosäuren [Zheng et al. 2001a]. Das Translationsprodukt umfasst ein Signalpeptid, eine kurzes Propeptid, eine Metalloproteasedomäne, eine dysfunktionelle Disintegrin-ähnliche Domäne, ein Thrombospondin-1-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, einen ADAMTS spacer, 7 weitere Thrombospondin-1-Domänen und schließlich 2 CUB-Domänen (Abb. 5). ADAMTS-13 wird offensichtlich als Zymogen synthetisiert und benötigt demnach proteolytische Aktivierung, möglicherweise intrazellulär durch Furin [Zheng et al. 2001a]. Alternatives splicing führt zur Synthese von mindestens 7 Proteinvarianten [Levy et al. 2001; Zheng et al. 2001a], welche nicht nur die Aktivität von ADAMTS-13, sondern zudem die Interaktion des Proteins mit Kofaktoren, anderen Substraten, Thrombozyten, dem Endothel oder anderen Geweben regulieren könnten.

In den letzten Monaten wurden zahlreiche Mutationen im ADAMTS13-Gen bei Patienten mit familiärer TTP identifiziert [Kokame et al. 2002; Schneppenheim et al. 2003b, Savasan et al. 2003, Antoine et al. 2003, Assink et al. 2003; Bestetti et al. 2003]. Die verschiedenen Mutationen verteilen sich über das gesamte ADAMTS13-Gen und unterstreichen damit die bislang unbekannte Bedeutung der unterschiedlichen nicht-katalytischen Domänen von ADAMTS-13. Es wurden Missense, Splice site und Frame shift Mutationen identifiziert. Bislang wurden zwei wiederkehrende Mutationen identifiziert, welche vermutlich auf gemeinsame Vorfahren der betreffenden Familien zurückzuführen sind [Levy et al. 2001; Schneppenheim et al. 2003b]. Die P353L-Missense Mutation im Exon 9 wurde dahingegen von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen in Deutschland [Schneppenheim et al. 2003b] und in den Niederlanden [Assink et al. 2003] gefunden und ist damit die bislang einzig bekannte, wiederkehrende Mutation, welche sehr wahrscheinlich nicht auf gemeinsame Vorfahren zurückzuführen ist. Bemerkenswerterweise wurden keine Nullallele gefunden, was die Vermutung nahe legt, dass kompletter ADAMTS-13-Mangel letal ist.

Kokame et al. [2002], Plaimauer et al. [2002], Zheng et al. [2002b], Soejima et al. [2003], Schneppenheim et al. [2003a], Peyvandi et al. [2003] und Plaimauer et al. [2003] konnten ADAMTS13 klonieren und in HeLa, HEK293 oder COS7 Zellen exprimieren. Die in vitro Expression von ADAMTS-13 erlaubt die funktionelle Charakterisierung des Proteins [Plaimauer et al. 2002] und seiner unterschiedlichen Domänen [Zheng et al. 2002b; Soejima et al. 2003] und Mutanten [Kokame et al. 2002; Schneppenheim et al. 2003a; Plaimauer et al. 2003; Peyvandi et al. 2003]. Desweiteren ermöglicht die in vitro Expression theoretisch die kommerzielle Produktion rekombinanter ADAMTS-13 für die Therapie von Patienten mit TTP.

1.4.3. ADAMTS-13 und der VWF-Metabolismus

Die TTP bzw. der schwere ADAMTS-13-Mangel offenbart die Bedeutung von ADAMTS-13 für die physiologische Hämostase, insbesondere für den VWF-Metabolismus. Die TTP ist gewissermaßen das Gegenstück zum Von Willebrand Syndrom (Kap. 1.2.3.), da es hier zu einem Überschuss an hämostaseologischer VWF-Aktivität kommt. Diese Hyperaktivität des Von Willebrand Faktors ist eine Folge der fehlenden oder erniedrigten VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13 und der damit einhergehenden, relativen Anreicherung großer VWF-Multimere (Kap. 1.2.2.). Der hochaktive VWF induziert eine Hyperaggregation der Thrombozyten und führt damit zu den TTP-typischen, hyalinen Thromben, welche einen hohen Gehalt an VWF und einen niedrigen Gehalt an Fibrin aufweisen [Asada und Sumiyoshi 1992; Hosler et al. 2003]. Yagi et al. [2001] konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass das Plasma von Patienten mit congenitalem ADAMTS-13-Mangel in vitro tatsächlich die Aggregation von Thrombozyten unter hohen Scherkräften erhöht. Die Abbildung 8 illustriert das gegenwärtige Verständnis der TTP-Pathophysiologie bzw. den allgemeinen Zusammenhang zwischen ADAMTS-13 und dem VWF-Metabolismus.

Die Spaltungsstelle für ADAMTS-13 liegt zwischen Tyr1605 und Met1606 in der A2-Domäne des VWF-Monomeres (Abb. 1). Aufgrund der kompakten, globulären Struktur des VWF-Moleküls (Kap. 1.2.1.) ist die Spaltungsstelle im zirkulierenden VWF einer Proteolyse durch ADAMTS-13 nicht zugänglich. Hohe Scherkräfte entfalten den VWF und legen damit nicht nur Bindungssepitope für Kollagen und Thrombozytenrezeptoren (Kap. 1.2.1.), sondern auch die spezifische Spaltungsstelle für ADAMTS-13 frei [Tsai 1996]. Hohe Scherkräfte führen bei normaler ADAMTS-13-Aktivität nicht zu einer TTP-Symptomatik, da die VWF-Aktivität durch einsetzende Proteolyse reguliert wird. Vereinfacht ausgedrückt könnte man ADAMTS-13 somit als physiologischen Inhibitor für den VWF betrachten. Patienten mit einem VWS, Typ 2A zeichnen sich durch eine erhöhte Proteolyse des VWF-Moleküls durch ADAMTS-13 aus, was zu einem Verlust der hochmolekularen Multimere und damit zur hämorrhagischen Diathese führt. Bei Patienten mit einem VWS, Typ 2A konnten Mutationen in der A2-Domäne nachgewiesen werden, die den VWF für eine gesteigerte Proteolyse durch ADAMTS-13 zugänglich machen [Dent et al. 1990; Furlan 1996].

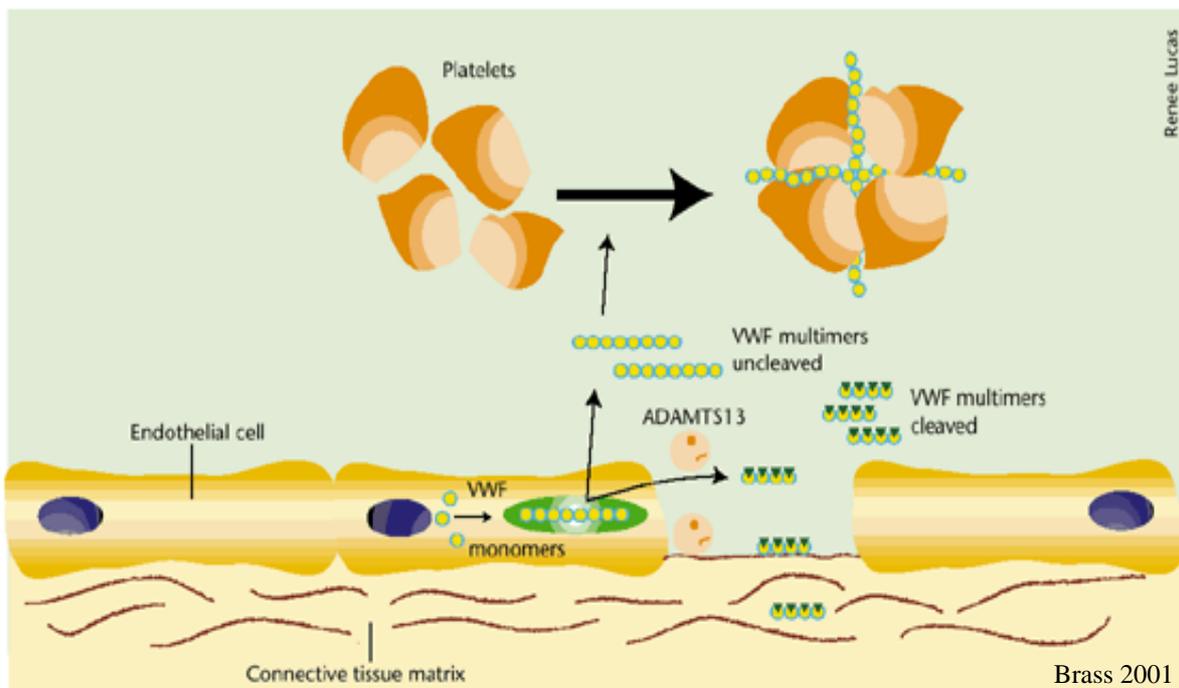


Abbildung 8: ADAMTS-13, TTP und der Von Willebrand Faktor Metabolismus

Erklärungen im Text

Inwieweit ADAMTS-13 den VWF-Gehalt im Plasma, bzw. die VWF-clearance reguliert ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Einige Arbeitsgruppen fanden eine Korrelation zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Antigen [Mannucci et al. 2002; Reiter et al. 2002], während andere dies nicht bestätigen konnten [He et al. 2001; Studt et al. 2003a]. Reiter et al. [2002] fanden eine inverse Korrelation zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Antigen bzw. VWF-Kollagenbindungsaktivität (VWF:CB) nach Desmopressin-Gabe. Die Autoren vermuteten einen Verbrauch von ADAMTS-13-Aktivität nach Desmopressin induzierter Freisetzung der hochmolekularen VWF-Moleküle aus den Weibel-

Palade-Bodies der Endothelzellen. Der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13 und den VWF Parametern bei Nicht-TTP Patienten und normalen Probanden [Mannucci et al. 2002; Reiter et al. 2002] weisen auf eine gegenseitige Regulation der Proteine hin. Damit ist ADAMTS-13 ein potentieller Kandidat für die Pathogenese von Erkrankungen, welche mit hohen VWF-Spiegeln im Zusammenhang stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser Hypothese die ADAMTS-13-Aktivität systematisch bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen (Kap. 3.4. bzw. 4.4.) und thromboembolischen Erkrankungen (Kap. 3.5. bzw. 4.5.) untersucht.

1.4.4. ADAMTS-13, TTP und andere Erkrankungen

Der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13 und TTP wurde in den letzten zwei Jahren heftig diskutiert. Die Spezifität des ADAMTS-13-Mangels für die TTP wurden angezweifelt, da man auch bei Patienten mit malignen Erkrankungen [Oleksowicz et al. 1999], dekompensierter Leberzirrhose [Mannucci et al. 2001], systemischem Lupus erythematodes, idiopathischer Thrombozytopenie, Verbrauchskoagulopathie [Moore et al. 2001] und HUS [Remuzzi et al. 2002] eine hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität (<5%) fand (Tab.1). Andere Arbeitsgruppen fanden einen milden ADAMTS-13-Mangel in verschiedenen thrombozytopenen [Loof et al. 2001; Bianchi et al. 2002a] und malignen Erkrankungen [Fontana et al. 2000; Koo et al. 2002; Mannucci et al. 2003a] sowie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und akuten Infektionen [Mannucci et al. 2001] (Tab. 1).

Des weiteren wurde ein Abfall der ADAMTS-13-Aktivität im postoperativen Stadium [Mannucci et al. 2001], nach Knochenmarkstransplantationen [Kentouche et al. 2003] und nach Stammzelltransplantation [Park et al. 2002] beobachtet. Darüber hinaus konnten Mannucci et al. [2001] bei normalen Probanden im Alter von über 65 Jahren und bei gesunden, schwangeren Frauen während des zweiten und dritten Trimenon eine erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität beobachten. Dieselbe Arbeitsgruppe fand außerdem eine erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität bei Neugeborenen [Mannucci et al. 2001], was allerdings in einer anderen Studie von Tsai et al. [2003] nicht bestätigt werden konnte.

Die zum Teil sehr kontroversen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen stellen die Maxime: TTP = ADAMTS-13-Mangel in Frage. Die derzeitige Forschung bemüht sich nun folgende Fragen zu beantworten:

- Ist der schwere ADAMTS-13-Mangel immer mit einer TTP-Symptomatik korreliert oder findet man einen ADAMTS-13-Mangel auch bei gesunden Personen oder Patienten mit anderen Erkrankungen (Spezifität)?
- Ist die TTP-Symptomatik immer mit einem schweren ADAMTS-13-Mangel korreliert oder findet man auch Patienten mit klinischer TTP, die eine normale (oder nur moderat erniedrigte) ADAMTS-13-Aktivität zeigen (Sensitivität)?

In der Tabelle 1 sind die hierzu relevanten Studien zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität des ADAMTS-13-Mangels untersucht. Für weitere Erläuterungen und Hypothesen zur Bedeutung des ADAMTS-13-Mangels bei Patienten mit TTP und anderen Erkrankungen sei auf das Kapitel 4.2. verwiesen, in dem die eigenen Ergebnisse mit den Befunden aus der Literatur diskutiert werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der bis Dezember 2003 veröffentlichten Studien über ADAMTS-13-Aktivität bei verschiedenen Erkrankungen

KMT=Knochenmarkstransplantation; TMA=thrombotische Mikroangiopathie; MAHA: mikroangiopathische, hämolytische Anämie; D+ bzw. D- HUS=Diarrhoe positives bzw. negatives hämolytisch-uremisches Syndrom; SLE=systemischer Lupus erythematodes; ITP=idiopathische Thrombozytopenie; DIC=disseminated intravascular coagulation (Verbrauchskoagulopathie); KHK=koronare Herzkrankheit; HIT II=Heparin induzierte Thrombozytopenie, Typ II; MDS=Myelodysplastisches Syndrom; VOD=hepatic veno-occlusive disease; SS=Schwangerschaft; SSc=systemische Sklerose; HELLP: schwere Komplikation der Schwangerschaftsgestose mit „hemolysis elevated liver enzymes und low platelets“

Klinische Diagnose:	Anzahl der Patienten mit schweren ADAMTS-13-Mangel:	Anzahl der Patienten mit mildem ADAMTS-13-Mangel:	Anzahl der Patienten mit normaler ADAMTS-13-Aktivität:	Referenz:
TTP	26 (86%)	4	0	Furlan et al. 1998
HUS	0	2	21	
TTP	39 (100%)	0	0	Tsai und Lian, 1998
Verschiedene	0	4	35	
KMT ass. TMA	0	1	7	Van der Plas et al. 1999
Metastasierender Tumor	10 (100%)	0	0	Oleksowicz et al. 1999
Lokalisierter Tumor	0	0	10	
Tumor ass. MAHA	0	2	2	Fontana et al. 2000
KMT ass. TMA	0	0	6	Arai et al. 2001
D+HUS	1 (2,4%)	2	39	Hunt et al. 2001
D+HUS	0	0	16	Tsai et al. 2001a
Leberzirrhose	4 (9,5%)	14	24	Mannucci et al. 2001
Chronische Niereninsuffizienz	0	3	60	
Akute Infektion	0	4	9	
TTP	47 (71%)	12	7	Veyradier et al. 2001
HUS	2 (4,4%)	4	39	
TTP	6 (30%)	3	11	Moore et al. 2001
SLE	2 (20%)	3	5	
ITP	1 (5%)	5	14	
DIC	3 (30%)	3	4	
TTP	4 (100%)	0	0	Loof et al. 2001
ITP	0	0	10	
DIC	0	12	2	
KHK	0	0	21	Hee et al. 2001
VWS, Typ 2A	0	0	3	

TTP	11 (92%)	1	0	Remuzzi et al. 2002
D-HUS	5 (56%)	1	3	
Sepsis	0	6	11	Bianchi et al. 2002a
HIT II	0	5	11	
ITP	0	0	10	
MDS	0	1	3	
Verschiedene	0	0	21	
Fortgeschrittener Tumor	0	6	0	Koo et al. 2002
Tumore in partieller Remission	0	0	5	
Darm-Tumor, WHO Grade III - IV	0	9	0	
Darm-Tumor, WHO Grade II	0	0	8	
KMT assoziierte VOD*	0	6	1	Park et al. 2002
KMT ohne VOD*	0	1	13	
TTP	12 (67%)	6	0	Mori et al. 2002
HUS	0	6	3	
D+HUS	1 (2,4%)	0	40	Veyradier et al. 2003
D-HUS	6 (26%)	0	17	
TTP	130 (100%)	0	0	Tsai 2003b
TTP	36 (97%)	0	1	Hulstein et al. 2003
TTP	44 (63%)	20 (28,5%)	6 (8,5%)	Studt et al. 2003d
HUS	0	36 (32%)	75 (68%)	
TTP, SZT assoziiert	0	3 (45%)	4 (55%)	
TTP, CA oder Medikamenten ass.	2 (14%)	5 (36%)	7 (50%)	
TTP-HUS**, idiopathisch	16 (33%)	15 (31%)	17(36%)***	Vesely et al. 2003
TTP-HUS, SS assoziiert	2 (20%)	0	8 (80%)***	
TTP-HUS, SZT assoziiert	0	1 (14%)	6 (86%)***	
TTP-HUS, Medikamenten assoziiert	0	1 (5%)	20(95%)***	
TTP-HUS, Diarrhoe assoziiert	0	1(10%)	9 (90%)***	
TTP, idiopathisch	56 (52%)	52 (48%)*****		Fujimura 2003
TTP, sekundär****	26 (25%)	79 (75%)*****		
HUS, idiopathisch	0	34 (100%)*****		
HUS, sekundär****	0	10 (100%)*****		
Metastasierender Tumor	0	12 (60%)	8 (40%)	Mannucci et al. 2003a
Lokalisierter Tumor	0	11 (38%)	18 (62%)	
SLE	0	2 (6%)	34 (94%)	Mannucci et al. 2003b
SSc	0	12 (14%)	75 (86%)	
HELLP	0	17 (100%)	0	Lattuada et al. 2003

*Angabe sind die ADAMTS-13-Aktivitäten vor Transplantation. Nach Transplantation kommt es zu einer Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität in beiden Gruppen, wobei sich dieser Abfall in der Gruppe der VOD+ Patienten nach 28 Tagen normalisiert, während dies bei den VOD- Patienten nicht der Fall ist.

**Die Autoren unterscheiden nicht zwischen TTP und HUS, da beide Syndrome in dieser Studie gleiche diagnostische Kriterien (Thrombopenie und mikroangiopathische hämolytische Anämie) und therapeutische Maßnahmen (PP-Therapie) aufweisen [siehe hierzu auch George 2000].

***Angabe sind jeweils die Anzahl der Proben mit einer ADAMTS-13-Aktivität >25%, da die Autoren nicht zwischen moderat erniedrigter (25-50%) und normaler (>50%) ADAMTS-13-Aktivität differenzieren.

****Sekundäre TTP bzw. HUS bezeichnet TTP/HUS Erkrankungen bei der Identifikation von potentiellen Auslösefaktoren wie z.B. Infektionen, Malignität, Autoimmunerkrankungen, KMT, Schwangerschaft.

*****Bei dieser Studie wurde der Anteil der Proben mit mildem ADAMTS-13-Mangel (3-50%) nicht angegeben.

1.5. Methoden zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität

Für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität inkubiert man prinzipiell ein VWF-Substrat mit Plasma unter spezifischen Bedingungen, die eine Proteolyse des Von Willebrand Faktors durch ADAMTS-13 zulassen. Die Tyr1605-Met1606 Spaltungsstelle des Substrates muss dazu, z.B. durch Scherkräfte oder durch Chemikalien, freigelegt werden (Kap 1.4.1.). Die enzymatische Reaktion benötigt in vitro gewöhnlich die Zugabe von zweiwertigen Kationen und ein Milieu niedriger Ionenstärke (Kap 1.4.1). Die Detektion der Proteolyse erfolgte ursprünglich durch **Sodiumdodecylsulfat-Agarose-Gelelektrophorese** (SDS-AGE) oder **Sodiumdodecylsulfat -Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) mit anschließendem Immunoblotting [Furlan et al. 1996; Tsai 1996]. In den letzten Jahren wurden eine Reihe weiterer Verfahren zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität entwickelt, die neben den herkömmlichen Methoden im Folgenden erläutert werden (Kap. 1.5.1.-1.5.7.).

1.5.1. SDS-Agarose-Gelelektrophorese nach Furlan et al. [1996]

Für die Gewinnung des Substrates wird der VWF aus Kryopräzipitat mittels Gelfiltration isoliert. Für die Reaktion wird das Plasma 1:20 mit 150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,4 verdünnt. Der Reaktionspuffer enthält den Serinproteaseinhibitor Pefabloc SC in einer Endkonzentration von 1mM. Anschließend wird das Plasma in Gegenwart von 10 mM BaCl₂ 5 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Protease zu aktivieren. Da die Reaktion stark von der Ionenstärke des Mileus abhängig ist (Kap. 1.4.1.), wird das Substrat und das aktivierte Plasma (Verdünnung 1:2) auf einen hydrophilen Filter gegeben, welcher auf einer niedrigmolaren Dialyselösung (1,5 M Harnstoff, 5 mM TRIS, pH 8) schwimmt. Nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 12,5 mM) gestoppt. Die Degradierung des VWF-Substrates wird gemessen, indem die Multimerenstruktur nach Ruggeri und Zimmerman [1981] analysiert wird. Dazu wird der Reaktionsmix durch SDS-1,5%ige-AGE aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der VWF wird durch Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Antikörper gegen humanen VWF visualisiert. Der Verlust der hochmolekulen VWF-Multimere ist umgekehrt proportional zur ADAMTS-13-Aktivität in der getesteten Plasmaprobe.

1.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Tsai [1996]

Das VWF-Substrat wird durch Fällung mit Glycin und Gelfiltration aus normalem, humanen Plasma isoliert. Dann wird das Substrat in Gegenwart von 1,5 M Guanidiumhydrochlorid entfaltet und für die anschließenden Reaktion gegen 5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6 dialysiert, um das Guanidiumhydrochlorid zu entfernen. Jede Plasmaprobe wird 1:3 mit 50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 8 in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM EDTA verdünnt. Nach Zugabe des Substrates in einer Verdünnung von 1:10 wird der Reaktionsmix eine

Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Probenpuffer für die anschließende SDS-6%ige-PAGE gestoppt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der VWF wird durch ¹²⁵I-markierten Kaninchen-Antikörper gegen humanen VWF visualisiert. Die Proteolyse durch ADAMTS-13 produziert die spezifischen C-terminalen 350 kDa und N-terminalen 200 kDa Dimere (Kap. 1.4.1.). Die Radioaktivität der 350 kDa Bande in Abwesenheit von EDTA wird mit der Radioaktivität der 350 kDa Bande in Gegenwart von EDTA verglichen, um das Ausmaß der Proteolyse durch ADAMTS-13 zu quantifizieren.

1.5.3. Kollagenbindungstest nach Gerritsen et al. [1999]

Bei diesem Verfahren wird die zeit- und arbeitsaufwendige Elektrophorese mit dem anschließendem Immunoblotting durch einen Kollagenbindungstest ersetzt. Das Plasma wird 1:10, 1:20 und 1:40 mit 5 mM TRIS, pH 8 verdünnt und nach Zugabe von BaCl₂ zu einer Endkonzentration von 8,4 mM 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Protease zu aktivieren und um den endogenen VWF zu verdauen. Das VWF-Substrat wird in einer Verdünnung von 2:1 zugegeben, worauf der Reaktionsmix für 2 weitere Stunden bei 37°C inkubiert wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von Na₂SO₄ (Endkonzentration: 50 mM) gestoppt. Anschließend wird die verbleibende VWF-Kollagenbindungsaktivität (VWF:CB) nach Siekmann et al. [1998] bestimmt. Dazu wird eine Mikrotiterplatte mit Kollagen, Typ III beschichtet und mit einer hochprozentigen Rinderserumalbumin-Lösung geblockt. Der Reaktionsmix wird 1:5 mit einem Phosphatpuffer verdünnt und auf die Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer 2 stündigen Inkubation wird die Platte gewaschen und der gebundene VWF durch Peroxidase-konjugiertem Kaninchen Antikörper gegen humanen VWF quantifiziert. Da die VWF:CB durch die Größe der Multimeren bestimmt wird, ist der gebundene VWF-Gehalt ein Maß für die ADAMTS-13-Aktivität in der getesteten Plasmaprobe.

1.5.3. Zwei-seitiger ELISA mit monoklonalen Antikörpern nach Obert et al. [1999]

Bei dieser Methode wird die Degradierung eines rekombinanten VWF-Substrates durch einen ELISA mit unterschiedlichen, monoklonalen Antikörpern gegen humanen VWF gemessen. Das Plasma wird 1:20 mit 5 mM TRIS, pH 8 verdünnt und nach Zugabe von BaCl₂ zu einer Endkonzentration von 10 mM zur Aktivierung der Protease 5 Minuten bei 22°C inkubiert. Das Substrat und das aktivierte Plasma wird in einem Verhältnis von 2:3 auf einen hydrophilen Filter gegeben, welcher auf einem 5 mM TRIS Puffer, pH 8 inklusive 1,5 M Harnstoff schwimmt. Nach einer 18 stündigen Inkubation bei 22°C werden die Filter einer zweiten Dialyse mit 5 mM TRIS Puffer, pH 8 inklusive 150 mM NaCl und 10 mM EDTA unterzogen (4 Stunden bei 22°C), um den Harnstoff zu entfernen und die Reaktion zu stoppen. Zur Analyse des degradierten VWF-Monomeres wird ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, wobei die Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper gegen des C-terminale Ende des VWF-Monomers beschichtet wird.

Die Quantifizierung des gebundenen VWF-Moleküls erfolgt mit einem Pool von ^{125}I -markierten, monoklonalen Antikörpern gegen das N-terminale Ende des VWF-Monomers. Da die Proteolyse durch ADAMTS-13 zu einer Trennung von N- und C-Terminus des VWF-Monomeres führt, resultiert die Proteolyse durch ADAMTS-13 zu einer konzentrationsabhängigen Erniedrigung des ^{125}I -markierten VWF-Substrates.

1.5.4. Erniedrigung der endogenen VWF:CB bzw. des endogenen Multimerenmusters durch Dialyse nach Aronson et al. [2001]; Rick et al. [2002] und Krizek und Rick [2001]

Bei diesem Verfahren wird die Kollagenbindungsaktivität oder das Multimerenmuster des endogenen VWF-Moleküls vor und nach Dialyse analysiert. Die Dialyse wird bei niedriger Ionenstärke und in Gegenwart von Harnstoff durchgeführt, um die Protease zu aktivieren und den endogenen VWF zu entfalten. Die Proteolyse des VWF-Moleküls führt zu einem Verlust der hochmolekularen Multimere, was durch eine Analyse des Multimerenmusters mittels SDS-AGE oder durch die Erniedrigung der VWF-Kollagenbindungsaktivität detektiert wird. Die Methode erlaubt allerdings im gegenwärtigen Stadium nur eine semiquantitative Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität [Rick et al. 2002]. Für die Analyse des Multimerenmusters wird die Plasmaprobe über Nacht bei 37°C gegen 10 mM TRIS, 1 M Harnstoff, pH 8 dialysiert [Krizek und Rick 2001]. Für die Bestimmung der Dialyse-induzierten Erniedrigung der VWF:CB wird die Plasmaprobe 3 Stunden bei 37°C gegen 5 mM TRIS, 1,5 M Harnstoff, pH 8,3 dialysiert [Aronson et al. 2001; Rick et al. 2002].

1.5.5. ELISA mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörpern nach He et al. [2001]

Bei diesem Verfahren wird das Substrat (hochgereinigter VWF) auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Der endogene VWF der Plasmaprobe wird zunächst durch Inkubation mit Kaninchen-Antikörper gegen humanen VWF aus der Probe entfernt. Anschließend wird die Probe in Gegenwart von Pefabloc SC, CaCl_2 und Harnstoff in die Mikrotiterplatte überführt und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. ADAMTS-13 spaltet dabei den gebundenen VWF, was zu einem Verlust der 1605Tyr-1606Met-Bindung führt. Nach der Reaktion wird die Platte gewaschen und der ungespaltene VWF durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen die 1605Tyr-1606Met-Spaltungsstelle gemessen.

1.5.6. Synthetische und rekombinante Substrate

Furlan und Lämmle [2002] testeten 28 synthetische, chromogene Peptide auf ihre Spaltbarkeit durch ADAMTS-13. Bei den getesteten Peptiden ließ sich allerdings keine ADAMTS-13 spezifische Proteolyse beobachten. Die Autoren vermuten, dass ADAMTS-13 für die

enzymatische Spaltung der 1605Tyr-1606Met-Bindung weitere, VWF-spezifische Aminosäuren in der Umgebung der Spaltungsstelle benötigt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Furlan et al. [2002] beschrieben Montgomery et al. [Blood CT Res Foundation 2002] in ihrer veröffentlichten Patentschrift die erfolgreiche Proteolyse eines synthetischen, chromogenen Peptides durch ADAMTS-13. Die Erfinder berichten des weiteren über eine ADAMTS-13-pezifische Proteolyse von verschiedenen, rekombinanten VWF-Fragmenten. Die Affinität dieser VWF-Fragmente für ADAMTS-13 kann durch Einführung spezifischer Mutationen erhöht werden. Zudem produzierte die Arbeitsgruppe ein rekombinantes VWF-Fragment, welches am N-Terminus ein grün fluoreszierendes Protein trägt [Raife et al. 2001]. Die Anwendbarkeit der dort dargestellten, synthetischen und rekombinanten Substrate im klinischen Labor ist allerdings bislang noch nicht gezeigt worden.

1.5.7. Ausblick auf weitere Verfahren zur ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung

Die unter 1.4.1. erläuterten Ergebnisse von Dong et al. [2002] zeigten, dass ADAMTS-13 den von der stimulierten Endothelzelle sezernierten VWF innerhalb weniger Sekunden spaltet. Der Versuchsaufbau von Dong et al. (Fließkammer mit Videomikroskop) erlaubt prinzipiell auch die Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität einer beliebigen Plasmaprobe [Amar et al. 2002]. Dieser Test ist den physiologischen Bedingungen angepasst, da er auf den Endothelzelloberfläche stattfindet und direkt den sezernierten und damit entfaltenen VWF unter Fluß spaltet. Der Test dauert nur wenige Minuten, benötigt jedoch eine sehr spezielle und aufwendige Laborausüstung und ist daher nur für wenige Labors verfügbar.

Shenkman et al. [2003] konnten in diesem Jahr zeigen, dass die Thrombozyten-Adhäsion in einem „Platelet Cone Analyser“ in Gegenwart von TTP-Plasma gegenüber normalem Plasma signifikant erhöht ist. Bei diesem Verfahren werden in einem kommerziell erhältlichen Gerät ein Gemisch aus Plasmaprobe und normalem Vollblut auf eine Polyesterol Platte gegeben und für 2 Sekunden einer hohen Fließgeschwindigkeit ausgesetzt. Die Anzahl und Ausbreitung der gebundenen Thrombozyten an der Polyesterolplatte wird anschließend mikroskopisch bestimmt. Das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion scheint mit der ADAMTS-13-Aktivität in der getesteten Plasmaprobe zu korrelieren ($r=0,53$, $p<0,007$) [Shenkman et al. 2002]. Es ist allerdings unklar, ob dieser Zusammenhang eine sekundäre Folge der ADAMTS-13-Aktivität ist (z.B. durch einen ADAMTS-13 bedingte Anreicherung von hochmolekularen VWF-Multimeren) oder ob das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion direkt von der ADAMTS-13-Aktivität in der Probe bestimmt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der SDS-AGE (Kap. 1.5.1.) mit geringfügigen Modifikationen im Labor der hämostaseologischen Ambulanz aufgebaut (Kap. 3.1.1.). Da diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurde eine neues Verfahren zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität entwickelt und anhand der herkömmlichen SDS-AGE-Methode validiert (Kap. 3.1.3. bzw. 4.1.).

2. Material und Methoden

2.1. Blutentnahme und -verarbeitung

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten und gesunden Probanden durch herkömmliche Venenpunktion, wobei das zu untersuchende Blut mittels Butterfly-Nadeln der Größe 0,8 mm bzw. 1,1 mm (BD Valu-SetTM von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Fertigmonovetten der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) aufgezogen wurde. Für die Analyse der Gerinnungsparameter wurde Citratblut (1 Teil Natriumcitrat-Lösung, 0,11 mol/l und 9 Teile Venenblut) verwendet. Für die Bestimmung der Thrombozytenanzahl und der Hämoglobinkonzentration, für den Nachweis von Fragmentozyten im Blutausschlag und für die Gewinnung einer Leukozyten angereicherten Fraktion („Buffy Coat“) wurde EDTA-Blut entnommen. Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenasekonzentration (LDH) und der Gehalt am C-reaktiven Protein (CRP) wurde im Serum gemessen.

Die in den Kapiteln 2.4.–2.7. aufgeführten Methoden wurden mit thrombozytenarmen Citratplasma durchgeführt. Dazu wurde das Citratblut 40 Minuten bei 2500g und 4°C zentrifugiert (Rotina 48 RS- oder Universal 30 RF- Zentrifuge der Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Das im Überstand befindliche Plasma wurde bis zum Gebrauch in Portionen von 0,5 - 1 ml bei –20°C gelagert.

Für die Kalibration der ADAMTS-13-Aktivitäts- und der VWF:Antigen-Bestimmung (Kap. 2.4.-2.5.; 2.7.) wurde ein **normaler, humaner Plasmapool (NHP)** hergestellt. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen Citratplasma von 80 gesunden Probanden aus dem Normalkollektiv I (Kap. 2.2.1.) miteinander gemischt. Der so gewonnene Plasmapool wurde portioniert und bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert. Der NHP diente außerdem als Referenzplasma für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 (Kap. 2.6.).

2.2. Normalkollektive

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 3 Normalkollektive (Kap. 2.2.1.-2.2.3.) mit unterschiedlicher Alters- und Geschlechterverteilung untersucht. Dazu wurden gesunde Probanden rekrutiert, welche sich freiwillig einer Blutentnahme unterzogen.

2.2.1. Normalkollektiv I

Das Normalkollektiv I (40 Männer und 40 Frauen) diente zur Herstellung von NHP (Kap. 2.1.) und zur Erstellung des Normalbereiches für die ADAMTS-13-Aktivität. Die Abbildung 9 zeigt die Altersverteilung der Männer (schwarze Säulen) und der Frauen (graue Säulen). Das mittlere Alter beträgt MW +/- SD = 31 +/- 11. In der statistischen Analyse zeigt sich eine fehlende Normalverteilung des Alters ($p < 0,2$; Kolmogoroff-Smirnoff-Lilliefors-Test).

Im nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test unterscheidet sich das Alter der Frauen (MW \pm SD = 30 \pm 10) nicht signifikant ($p > 0,05$) von dem Alter der Männer (MW \pm SD = 33 \pm 11).

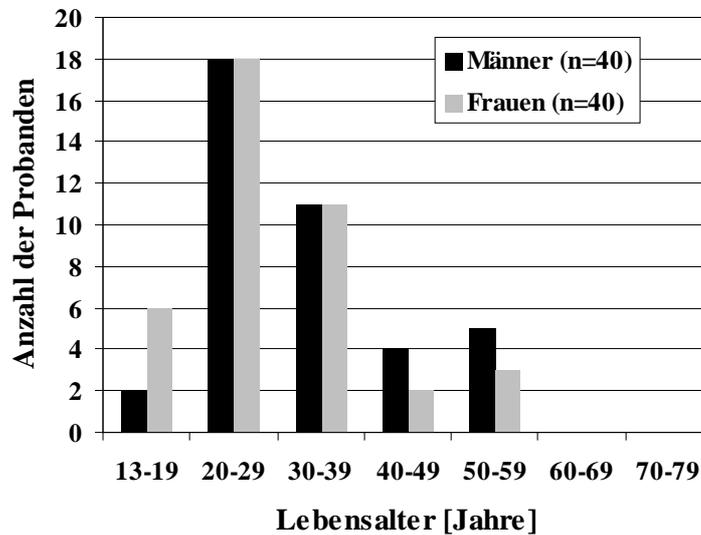


Abbildung 9: Die Alters- und Geschlechterverteilung im Normalkollektiv I

2.2.2. Normalkollektiv II

Als Kontrollgruppe für das Kollektiv mit malignen Erkrankungen (Kap. 2.3.3.) wurden 30 gesunde Probanden (Normalkollektiv II) mit einer angepassten Alters- und Geschlechterverteilung rekrutiert (Abb. 10). Das Probandenalter des Normalkollektives II liegt zwischen 36 und 72 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 60 \pm 11 (MW \pm SD).

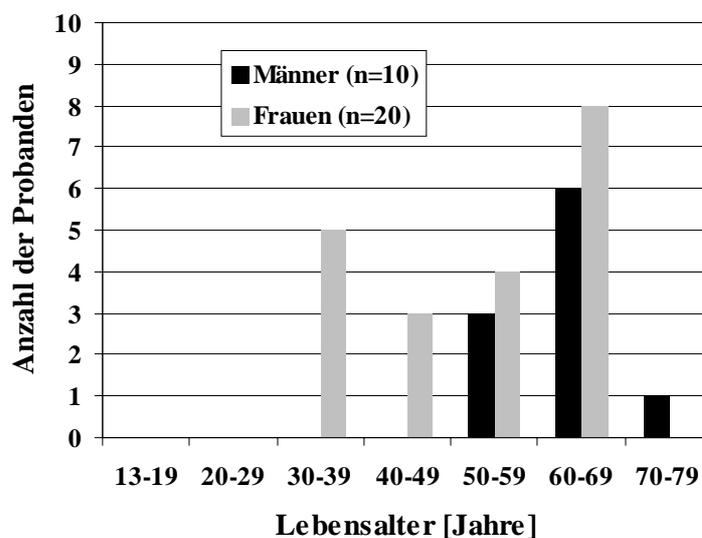


Abbildung 10: Die Alters- und Geschlechterverteilung im Normalkollektiv II

2.2.3. Normalkollektiv III

Das Normalkollektiv III (35 Männer und 35 Frauen; Abb. 11) diente als Kontrollgruppe für das Patientenkollektiv mit diversen hämatologischen Erkrankungen (Kap. 2.3.2.) und für das Patientenkollektiv mit thromboembolischen Erkrankungen (Kap. 2.3.4.). Das Probandenalter des Normalkollektives III liegt zwischen 21 und 72 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 45 +/- 15 (MW+/-SD).

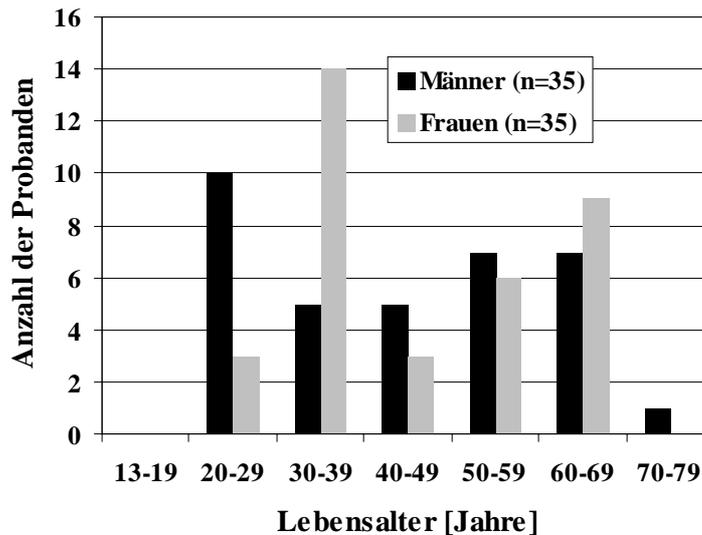


Abbildung 11: Die Alters- und Geschlechtsverteilung im Normalkollektiv III

2.3. Patientenkollektive

2.3.1. Patienten mit TTP

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die ADAMTS-13-Aktivität in 815 Plasmaproben von 29 Patienten (Männer/Frauen = 8/21) mit TTP untersucht. Sämtliche Patienten wurden innerhalb der letzten 10 Jahre in der Johann-Wolfgang-Goethe Universitätsklinik Frankfurt am Main aufgrund ihrer TTP stationär und/oder ambulant behandelt.

Die Diagnose der TTP erfolgte stets durch die behandelnden Ärzte. Sie stützte sich klinisch auf die TTP-typischen, neurologischen Symptome wie Kopfschmerz, Aphasie, Paresen, Bewusstseinstörungen und Krampfanfälle sowie anderer Symptome wie Fieber, Hämaturie, Purpura und Hämatome. Laborchemisch zeigte sich bei allen Patienten eine mikroangiopathische, Coombs-negative, hämolytische Anämie war (Kap. 1.3.). Die meisten Patienten demonstrierten eine unauffällige Globalgerinnung (normale TPZ und aPTT, normaler Gehalt an Fibrinogen, Antithrombin und D-Dimeren). Vereinzelt wurde bei Aufnahme eine erhöhter Fibrinogen- oder/und D-Dimere-Spiegel festgestellt.

Alle Patienten präsentierten klinisch eine erworbene TTP, da kein Patient eine TTP-positive Familienanamnese aufwies. Zudem betrug das Alter bei Erstmanifestation mindestens 13 Jahre, was eine familiäre TTP nicht grundsätzlich ausschließt, aber auch nicht sehr wahrscheinlich macht.

Die Abbildung 12 zeigt die Altersverteilung der Patienten bei Erstmanifestation. Das Durchschnittsalter der Frauen liegt signifikant niedriger als das Durchschnittsalter der Männer ($MW_{\text{Frauen}} \pm SD = 33 \pm 14$; $MW_{\text{Männer}} \pm SD = 45 \pm 8$; $p = 0,02$; Zweistichproben-t-Test). Der Frauenanteil liegt mit 72% deutlich höher als der Männeranteil (28%). Diese Geschlechterverteilung entspricht den Daten in der Literatur, nach denen Frauen (insbesondere Frauen im gebärfähigen Alter) doppelt so oft betroffen sind als Männer [Allford und Machin 2000].

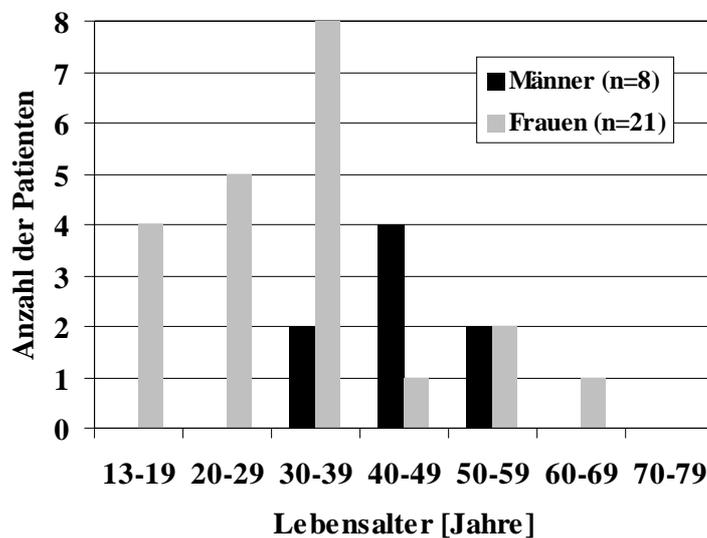


Abbildung 12: Die Alters- und Geschlechterverteilung bei Patienten mit TTP

Der Beobachtungszeitraum für die einzelnen Patienten variiert zwischen 1 und 253 Monaten ($MW \pm SD = 76 \pm 71$). Bei 18/29 Patienten konnte die ADAMTS-13-Aktivität in akuter Phase und in Remission untersucht werden. Bei 9/29 Patienten konnte die ADAMTS-13-Aktivität nur in klinischer Remission untersucht werden, da keine Probe aus einem akuten TTP-Schub zur Verfügung stand. Zwei Patienten konnten nur in der akuten Phase getestet werden, da eine Patientin bei Erstmanifestation verstarb und eine weitere Patientin in einem ausländischen Krankenhaus (USA) weiterbehandelt worden ist. Es ergibt sich zusammenfassend eine sehr unterschiedliche Datenlage für die einzelnen Patienten. Die Tabelle 2 zeigt die relevanten Patientendaten.

Tabelle 2: Alter, Beobachtungszeitraum und Anzahl der Rezidive für 29 Patienten mit TTP

w: weiblich

m: männlich

ED: Erstmanifestation

Pt: Patient(in)

Beobachtungszeitraum: Zeitraum zwischen Erstmanifestation und August 2003

18 Patienten wurden sowohl in akuter Phase als auch in Remission untersucht, 2 Patienten wurden nur während ED und 9 Patienten wurden nur in Remission untersucht (siehe Sonstiges)

	Patient	w/m	Alter bei ED [Jahre]	Beobachtungs-Zeitraum [Monate]	Anzahl der Rezidive	Sonstiges
1	Ah.M.	w	19	253	6	
2	Ar.M.	w	52	28	0	
3	C.E.	w	28	-	?	Pt nur bei ED untersucht
4	C.P.	w	21	1	0	
5	D.S.	w	35	-		Pt bei ED verstorben
6	E.L.	m	46	44	2	
7	F.S.	w	31	79	0	Pt nur in Remission untersucht
8	G.S.	m	34	44	1	
9	G.D.	w	41	1	0	
10	H.P.	m	49	75	9	
11	H.M.	w	67	20	0	
12	H.R.	w	47	15	0	
13	H.B.	w	32	85	3	
14	J.I.	w	30	77	0	Pt nur in Remission untersucht
15	K.S.	w	19	116	0	Pt nur in Remission untersucht
16	K.A.	w	23	146	2	Pt nur in Remission untersucht
17	L.E.	m	51	44	0	
18	M.E.	w	37	104	1	Pt nur in Remission untersucht
19	Mo.M.	w	39	5	0	
20	M.A.	w	27	25	1	
21	Mü.M.	w	30	145	1	Pt nur in Remission untersucht
22	M.S.	w	13	215	3	
23	P.P.	m	44	87	0	Pt nur in Remission untersucht
24	R.K.	m	36	27	1	
25	S.N.	w	15	110	1	Pt nur in Remission untersucht
26	S.F.	m	58	5	2	
27	T.H.	w	53	230	8	
28	T.D.	w	29	63	0	Pt nur in Remission untersucht
29	Z.S.	w	35	16	0	

2.3.2. Patienten mit diversen hämatologischen Erkrankungen

Zwischen Januar 2001 und August 2003 wurde die ADAMTS-13-Aktivität bei 108 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen untersucht (Tab. 3). Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit einer TTP-untypischen, thrombotischen Mikroangiopathie (HUS, KMT-assoziierte TMA) oder bei Patienten mit einer akuten Hämolyse unklarer Genese diente in erster Linie zur Differentialdiagnose zwischen TTP und anderen mikroangiopathischen bzw. hämolytischen Erkrankungen. Die Messung der ADAMTS-13-Aktivität bei diversen anderen Erkrankungen, die ebenfalls zumeist mit einer Thrombozytopenie und/oder Hämolyse einhergehen, erfolgte, um die Spezifität und Sensitivität des ADAMTS-13-Mangels für die TTP zu untersuchen. Die Patientenkollektive wurden aufgrund der Alterstruktur (Tab. 3) mit dem Normalkollektiv III verglichen. Das Alter der Patienten unterscheidet sich nicht signifikant vom Alter der Kontrollen ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Table 3: Patientenkollektiv mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen

m: männlich / w: weiblich; MW \pm SD: Mittelwert \pm Standardabweichung; n: Anzahl

HUS: Hämolytisch-uremisches Syndrom; TMA: thrombotische Mikroangiopathie; LE: Lungenembolie; HELLP: schwere Komplikation der Schwangerschaftsgestose mit „hemolysis elevated liver enzymes und low platelets“

Erkrankung	Alter [Jahre]		Geschlecht m/w	n
	Bereich	MW \pm SD		
Antiphospholipid Syndrom (APS)	24-80	48 \pm 19	13/11	24
Idiopathische Thrombozytopenie (ITP)	19-77	44 \pm 19	9/14	23
Akutes HUS	7-68	39 \pm 18	8/7	15
Akute Tumor-assoziierte TMA	27-53	39 \pm 13	2/1	3
Akute KMT-assoziierte TMA	37-43	40 \pm 4	1/1	2
Akute Hämolyse unklarer Genese	16-76	48 \pm 17	5/8	13
Akute Sepsis	19-62	50 \pm 16	5/1	6
Akuter Herzinfarkt	26-64	46 \pm 16	4/1	5
Schwere Blutungen	28-75	59 \pm 19	4/1	5
Akute venöse Thrombose / akute LE	24-37	32 \pm 7	0/3	3
Akutes HELLP Syndrom	28-33	31 \pm 3	0/3	3
Akuter ischämischer Schlaganfall	46-47	46 \pm 0,7	0/2	2
Akute myeloische Leukämie		60	1/0	1
Akute Purpura Rheumatica		74	1/0	1
„Graft rejection“ nach Nierentransplantation		33	0/1	1
Akute Verbrauchskoagulopathie (DIC)		33	1/0	1
Gesamt	7-80	45 \pm 17	54/54	108
Normalkollektiv III	21-72	45 \pm 15	35/35	70

2.3.3. Patienten mit malignen Erkrankungen

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und Malignität zu untersuchen wurden in der vorliegenden Arbeit die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Antigen (VWF:Ag) bei 60 Patienten mit Hirntumoren und bei 20 Patienten mit Prostatatumoren bestimmt.

Die Diagnose der Patienten mit Hirntumoren erfolgte anhand der WHO Klassifizierung. Die entsprechenden Tumortypen sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Meningeome WHO-GI bis GII, Hypophysen-Tumore und Oligodendrogliome WHO-GII wurden als benigne Tumore gruppiert. Glioblastome WHO-GIII bis GIV, Meningeome WHO-GIII und intracerebrale Metastasen wurden als maligne Tumoren klassifiziert. Die Primärtumore bei den Patienten mit den intracerebralen Metastasen waren in folgenden Organen lokalisiert: Lunge (n=6), Dickdarm (n=2), Brust (n=2), Haut (n=2), Pankreas (n=1) und Niere (n=1).

Die Diagnose der Prostatatumore erfolgte mittels der TNM Klassifizierung 1997. Patienten mit Sepsis, Verbrauchskoagulopathie und Leberzirrhose und Patienten mit Anzeichen von TTP oder einer Tumor-assoziierten TMA wurden von der Studie ausgeschlossen.

Die Patientenkollektive wurden mit 30 gesunden Probanden mit vergleichbarer Alters- und Geschlechterverteilung (Normalkollektiv II) verglichen. Die Abbildung 13 zeigt die Altersverteilung der jeweiligen Patientenkollektive und des Kontrollkollektives. Zwischen den untersuchten Kollektiven zeigt sich für das Alter kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 4: Patientenkollektiv mit Hirntumoren (A) und Prostatatumoren (B)

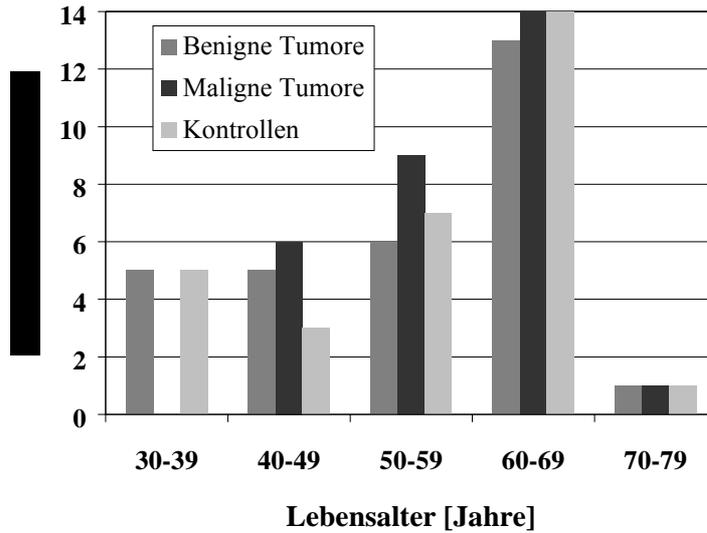
m: männlich / w: weiblich; n: Anzahl

(A) Patienten mit Hirntumoren

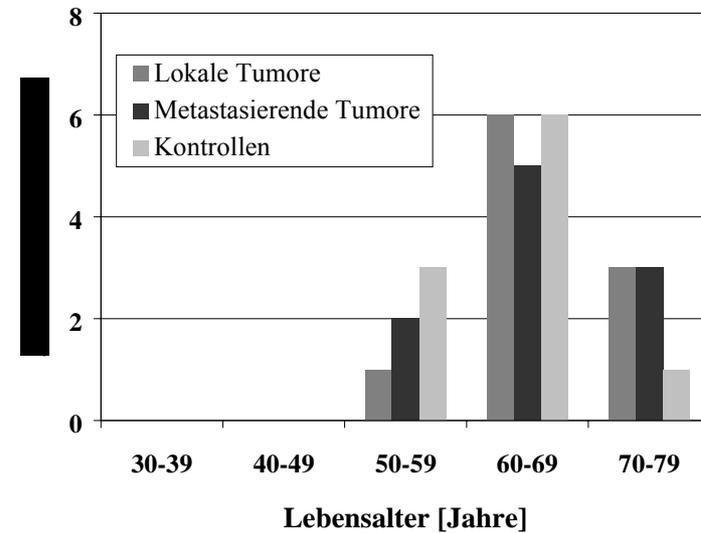
Histologische Diagnose	Alter [Jahre]		Geschlecht m/w	n
	Bereich	MW \pm SD		
Benigne Hirntumore	34-75	55 \pm 12	10/20	30
→ Meningeome WHO-GI	35-69	56 \pm 11	6/9	15
→ Meningeome WHO-GII	33-75	55 \pm 16	2/9	11
→ Hypophysentumore	44-66	58 \pm 12	2/1	3
→ Oligodendrogliom WHO-GII		39	0/1	1
Maligne Hirntumore	41-74	58 \pm 8	10/20	30
→ Glioblastome WHO-GIII/GIV	44-74	61 \pm 8	4/10	14
→ intracerebrale Metastasen	41-64	55 \pm 8	6/8	14
→ Meningeome WHO-GIII	60-67	64 \pm 5	0/2	2
Normalkollektiv II	36-72	60 \pm 11	10/20	30

(B) Patienten mit Prostatatumoren

Histologische Diagnose	Alter [Jahre]		n
	Bereich	MW ± SD	
Lokale Prostatatumore	51-79	65 ± 8	10
Metastasierende Prostatatumore	52-74	65 ± 7	10
Männer aus dem Normalkollektiv II	57-72	65 ± 5	10



(A) Patienten mit Hirntumoren und entsprechende Kontrollen



(B) Patienten mit Prostatatumoren und entsprechende Kontrollen

Abbildung 13: Altersverteilung bei den Patienten mit Hirntumoren (A) und Prostatatumoren (B) und den entsprechenden Kontrollen

2.3.4. Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und arteriellen bzw. venösen Thrombosen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Antigen (VWF:Ag) bei 70 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und bei 70 Patienten mit venösen Thrombosen (tiefe Beinvenenthrombosen, Augen- und Armvenenthrombosen) untersucht. Die Patientenkollektive wurden mit dem Alters- und Geschlechts-angepasstem Normalkollektiv III verglichen. Die Tabelle 5 und die Abbildung 14 zeigen die Altersverteilung der jeweiligen Patientenkollektive und des Kontrollkollektives. Statistisch ergibt sich für das Alter kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Kollektiven ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Alle Patienten wurden in klinischer Remission und in Abwesenheit akuter Infektionen getestet, um eine mögliche Akut-Phasen-bedingte Veränderung der ADAMTS-13-Aktivität (Kap. 4.3.) auszuschließen. Des weiteren wurden Patienten mit TTP, Leberzirrhose, renaler Insuffizienz sowie schwangere Frauen von der Studie ausgeschlossen.

Tabelle 5: Patientenkollektive mit thromboembolischen Erkrankungen

m: männlich/ w: weiblich; n: Anzahl

Diagnose	Alter [Jahre]		Geschlecht M/W	n
	Bereich	MW \pm SD		
Ischämische Schlaganfälle	20-71	46 \pm 16	35/35	70
Venöse Thrombosen	20-72	49 \pm 14	35/35	70
Normalkollektiv III	21-72	45 \pm 15	35/35	70

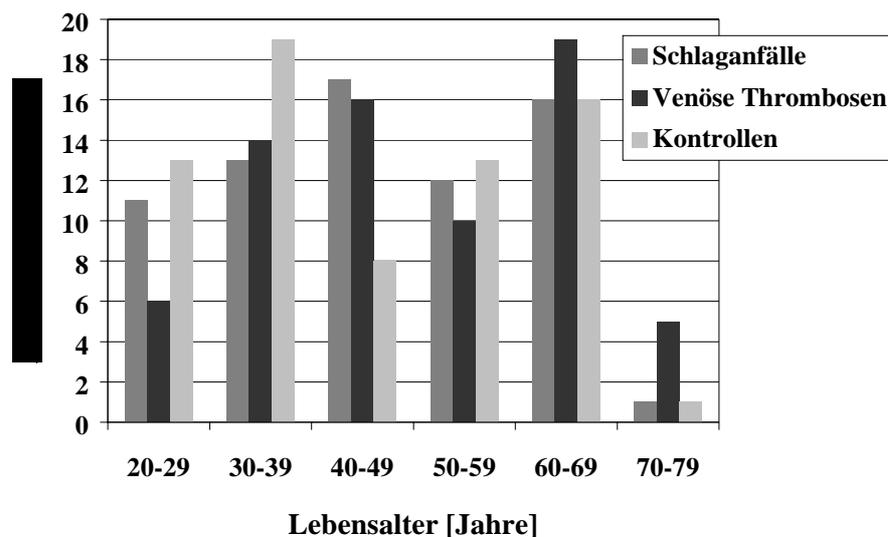


Abbildung 14: Altersverteilung bei den Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen und den entsprechenden Kontrollen

n=210 (Männer/Frauen=105/105)

2.4. ADAMTS-13 Aktivitätsbestimmung mit der Immunoblotting-Methode

Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität gemäß der herkömmlichen Immunoblotting-Methode erfolgte im wesentlichen nach Furlan et al. [1996]. Dabei wird ein ADAMTS-13 freies VWF-Substrat mit verdünntem Plasma über Nacht inkubiert. Unter den gegebenen Bedingungen (Aktivierung von ADAMTS-13 durch zweiwertige Kationen, niedrig molarer Puffer, Gegenwart von Harnstoff) kommt es bei dieser Inkubation zur enzymatischen Spaltung des VWF-Substrates zwischen Tyrosin1605 und Methionin1606 durch die im Testplasma vorhandene ADAMTS-13-Aktivität. Dies führt sukzessive zu einem Abbau der VWF-Multimere, was sich durch Multimerenanalyse mittels SDS-Agarosegelelektrophorese (SDS-AGE) und anschließendem Immunoblotting nachweisen lässt. Die Darstellung der VWF-Multimerenstruktur erfolgte hier mit geringfügigen Modifikationen nach Bukh et al. [1986].

a.) ADAMTS-13 Reaktionsansatz

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

Aqua a.i.: Aqua ad iniectabilia von Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland

Reaktionspuffer: 5 mmol/l $\text{NH}_2\text{C}[\text{CH}_2\text{OH}]_3$ (TRIS), pH 8,0 mit 5 mol/l HCl

PefaBloc SC: 4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid von AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

BaCl₂-Lösung: 1 mol/l

VWF-Substrat: „Concentre de Facteur Willebrand Humain Tres Haute Purite“ von Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB), Lille, Frankreich

Harnstoff-Lösung: 5 mol/l $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (p.A.) in Reaktionspuffer

Stopplösung: 0,2 mol/l Ethylendiamin-tetra-Essigsäure·Na₂-Salz (EDTA)

Durchführung:

Zunächst wird der Reaktionspuffer mit der BaCl₂-Lösung zu einer Endkonzentration von 12,5 mM und mit PefaBloc SC zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Das Testplasma wird 1:5 mit dem so vorbereiteten Reaktionspuffer verdünnt (10 µl Testplasma + 40 µl Puffer) und anschließend bei 37°C für 5 min zur Aktivierung von ADAMTS-13 inkubiert. Der Reaktionspuffer ist niedrigmolar (5 mmol/l) und enthält kein Natrium, da die Reaktion bei hoher Ionenstärke gehemmt wird [Furlan et al. 1996; Tsai 1996].

Für die Kalibration wird NHP (Kap. 2.1.) 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 mit Reaktionspuffer oder Imidazolpuffer verdünnt. Die verschiedenen Verdünnungen werden für die Bestimmung der Enzymaktivität wie die anderen Testproben 1:5 mit Reaktionspuffer versetzt. Der NHP

enthält definitionsgemäß 100% ADAMTS-13-Aktivität. In den Verdünnungen des Normalplasmas ergeben sich somit festgelegte ADAMTS-13-Aktivitäten von 50%, 25%, 12,5% und 6,25%. Für den 0%-Wert wird der Reaktionspuffer bzw. der Imidazolpuffer ohne Zugabe von NHP eingesetzt.

Das VWF-Konzentrat von LFB Frankreich enthält pro Flasche ca. 1000 Units Von Willebrand Faktor:Ristocetinkofaktor-Aktivität (VWF:RCo). Eine Flasche wird mit 10 ml Aqua a.i. rekonstituiert (30 Minuten Inkubation bei RT) und anschließend bis zum Gebrauch in 100 µl Portionen bei -20°C eingefroren. Für die Reaktion wird das Substrat bei RT aufgetaut und 1:15 bis 1:18 (abhängig von der Substratcharge) mit Harnstoff-Lösung verdünnt und zur Entfaltung des VWF-Substrates 5-30 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Entfaltung des VWF-Substrates wird 25 µl der Substrat-Lösung zu der aktivierten Testprobe zugegeben. Es ergibt sich eine Substratendkonzentration im Reaktionsmedium von 1,9 bis 2,2 U/ml. Die letztendliche Plasmaverdünnung im Reaktionsmedium beträgt 1:7,5.

Die Testproben werden anschließend über Nacht (15-20 h) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl der Stopplösung gestoppt (EDTA-Endkonzentration: 23,5 mM). Die Reaktion kann alternativ auch gestoppt werden, indem die Proben bei -20°C eingefroren werden oder direkt mit dem Propenpuffer für die Elektrophorese versetzt werden.

b.) SDS-Agarosegelelektrophorese:

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

Probenpuffer: 10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l Na₂-EDTA, 2 % Sodiumdodecylsulfat (SDS), 0,5 % Bromphenolblau, pH 8 mit 5 mol/l HCl

Trenngelpuffer: 375 mmol/l TRIS, 0,1 % SDS, pH 8,8 mit 5 mol/l HCl

Sammelgelpuffer: 125 mmol/l TRIS, 0,1 % SDS, pH 6,8 mit 5 mol/l HCl

Elektrophoresepuffer: 50 mmol/l TRIS, 0,1% SDS, 384 mmol Glycin, pH 8,35 mit 5 mol/l HCl

SeaKem-Agarose: „SeaKem HGT (P) Agarose“ von FMC BioProducts, Rockland, USA

Sigma-Agarose: „Agarose Typ VII, Low Gelling Temperature“ von Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Durchführung:

Zur Darstellung der Multimerenstruktur werden die individuellen VWF-Oligomere in einem großporigen, horizontalen Agarosegel in Anwesenheit von SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wird zunächst 7,5 µl des Reaktionsansatzes mit 25 µl Probenpuffer vermischt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert.

Zur Herstellung des Trenngels wird 1,4% Sigma-Agarose oder SeaKem-Agarose in Trenngelpuffer gelöst und zwischen zwei Glasplatten geschüttet. Nach dem Erstarren der Agarose wird über das Trenngel eine Sammelgel (0,75% SeaKem-Agarose in Sammelgelpuffer) gegossen. In das Sammelgel werden anschließend pro Gel 20 Probenauftragslöcher gestanzt, welche mit 25 µl der vorbehandelten Probe gefüllt werden. Die Elektrophorese erfolgt bei 18°C und einer konstanten Stromstärke von 15 mA über Nacht (18-24 h) in einer Apparatur von LKB Produkter AB, Bromma, Schweden (2117 Multiphor II Electrophoresis Unit).

c.) Immunoblotting:

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

Elektroelutionspuffer: 40,7 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 9,3 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 5 % SDS, pH 7,4

Fixierlösung: 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure in H_2O

Waschlösung I: 50 mmol/l TRIS, 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, pH 7,4 mit 5 mol/l HCl

Blockierlösung: 3 % Magermilchpulver von J.M.Gabler Saliter GmbH & Co.KG, Obergünzburg, Deutschland in Waschlösung I

Waschlösung II: 125 mmol/l TRIS, pH 7,4 mit 5 mol/l HCl

Kaninchen-Antikörper gegen humanen VWF: „Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor A 0226“ von Dako A/S, Glostrup, Dänemark

3,3-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Durchführung:

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine mittels Elektro-Elution auf eine Nitrozellulosemembran („Trans-Blot® Transfer medium, pure nitrocellulose membrane, 0,45 µm“ von Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) übertragen. Die Elektro-Elution erfolgt bei 4°C und einer Stromstärke von 1,0-1,5 A über 90 Minuten in einer Apparatur von LKB Produkter AB, Bromma, Schweden (2005 Transphor Power Supply).

Die Nitrozellulosemembran wird anschließend 30 Minuten in Fixierlösung inkubiert, um die Proteine auf der Membran zu fixieren. Nachdem die Membran 5 Minuten mit Wasser abgespült wird, werden die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose gebunden, indem die Membran 30 Minuten auf einem Schüttler in einer hochprozentigen Proteinlösung (Blockierlösung) inkubiert wird. Die Membran wird anschließend 5 Minuten mit Waschlösung I abgespült. Für die Immunoreaktion werden 100 µl des Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Antikörpers gegen humanen VWF in 50 ml Waschpuffer I gegeben und die Membran in der Antikörperlösung über Nacht (12-16h) inkubiert. Wie sich später

herausstellte, kann die Antikörperreaktion auf minimal 2 h verkürzt werden. Die Membran sollte dann allerdings auf einem Schüttler inkubiert werden, um die Antigen-Antikörperbindung zu beschleunigen. Nach der Antikörperbindung wird die Membran 4 mal für 15-30 Minuten mit Waschlösung I gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschrift (15-30 Minuten) mit Waschpuffer II. Für die Peroxidasereaktion wird 60 mg 3,3-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid in 100 ml Waschlösung II gelöst und mit 100 µl H₂O₂ versetzt. Die Membran wird in die Lösung gegeben und wenige Minuten inkubiert. Dabei kommt es zu einer Anfärbung der VWF-Multimere, da 3,3-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid unter Anwesenheit von H₂O₂ durch die, am Antikörper gekoppelte, Peroxidase zu einem braunen Farbstoff oxidiert wird. Die Farbreaktion wird gestoppt, indem die Membran mit Wasser gespült wird.

Die Immunoblotting-Methode erlaubt ohne densitometrische Auswertung keine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität. Die ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Plasmaprobe wird durch visuellen Vergleich mit der Kalibrationsreihe des jeweiligen Testes semi-quantitativ in folgende Kategorien eingeteilt:

- > 50%
- 25 – 50 %
- 12,5 – 25 %
- 6,25 – 12,5 %
- < 6,25 %

2.5. ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung mit der RCo-Methode

Die Immunoblotting-Methode für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ist sehr arbeits- und material-aufwendig und dauert 3-4 Tage. Die klinische Anwendbarkeit begrenzt sich daher im wesentlichen auf Studien mit geringem Probenaufwand. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus diesen Gründen eine neue Methode zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität entwickelt. Diese Methode bedient sich eines Routinetestes zur Bestimmung der VWF-vermittelten Agglutination von Thrombozyten. Die Spaltung des VWF-Substrates durch ADAMTS-13 führt sukzessive zu einem Abbau der hochmolekularen VWF-Multimere. Die Fähigkeit des Von Willebrand Faktors zur Agglutination von Thrombozyten ist proportional zum Anteil der hochmolekularen VWF-Multimere, da die Größe der VWF-Multimere die Bindungskapazität des Von Willebrand Faktors an die thrombozytären Glykoproteinrezeptoren bestimmt (Kap. 1.2.2.). Dieser Zusammenhang wird in dem neuen Verfahren ausgenutzt, um die Proteolyse des VWF-Substrates durch die ADAMTS-13-Aktivität im Testplasma zu detektieren. Dazu wird das Testplasma zunächst, ähnlich wie bei der Immunoblotting-Methode, mit Reaktionspuffer verdünnt und durch Anwesenheit von BaCl₂ aktiviert. Dann wird das entfaltete VWF-Substrat zugegeben und über Nacht bei 37°C durch ADAMTS-13 verdaut. Anschließend wird die, im Reaktionsmedium verbleibende Ristocetin-Kofaktoraktivität des VWF-Substrates

(VWF:RCo) gemessen. Dazu wird das Reaktionsmedium mit Thrombozyten und Ristocetin versetzt und das Ausmaß der VWF-vermittelten Agglutination der Thrombozyten in einem Gerinnungsautomaten aufgezeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass die verbleibende Fähigkeit des Von Willebrand Faktors zur Agglutination von Thrombozyten direkt von der ADAMTS-13-Aktivität im zugesetzten Testmedium abhängt. Damit lässt sich bei entsprechender Standardisierung die ADAMTS-13-Aktivität einer beliebigen Testprobe bestimmen.

a.) ADAMTS-13 Reaktionsansatz

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

Reaktionspuffer: 5 mmol/l TRIS, pH 8,0 mit HCl

Imidazolpuffer von Baxter Ag, Wien, Österreich

PefaBloc SC: 4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid von AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

BACl₂-Lösung: 1mol/l

VWF-Substrat: „Concentre de Facteur Willebrand Humain Tres Haute Purite“ von Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB), Lille, Frankreich

Harnstoff-Lösung: 5 mol/l CH₄N₂O. p.A. in Reaktionspuffer

Durchführung:

Das Testplasma wird 1:21 mit Reaktionspuffer verdünnt (10 µl Testplasma + 200 µl Puffer) und anschließend bei 37°C für 5 min zur Aktivierung von ADAMTS-13 inkubiert. Der Reaktionspuffer wird vor Gebrauch wie unter 2.1. beschrieben mit BACl₂ und PefaBloc SC versetzt.

Für die Kalibration wird der NHP wie unter 2.1. beschrieben mit Reaktionspuffer, Imidazolpuffer oder hitzeinaktiviertem Normalplasma (s.u.) verdünnt. Die verschiedenen NHP-Verdünnung werden für die Bestimmung der Enzymaktivität wie die Testproben 1:21 mit Reaktionspuffer versetzt. Der NHP enthält definitionsgemäß 100% ADAMTS-13-Aktivität. In den Verdünnungen des Normalplasmas ergeben sich somit festgelegte ADAMTS-13-Aktivitäten von 50%, 25%, 12,5% und 6,25%. Für den 0%-Wert wird der Reaktionspuffer bzw. der Imidazolpuffer ohne Zugabe von NHP eingesetzt. Bei der RCo-Methode wird zusätzlich eine Probe mitgeführt, welche 200% ADAMTS-13-Aktivität enthält. Dazu wird das NHP 1:11 mit Reaktionspuffer verdünnt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass die Test-Kalibration bei Verwendung von hitzeinaktiviertem NHP (dNHP) für die Verdünnung des Normalplasmas verbessert wird. Die Verwendung von hitzeinaktiviertem Plasma erniedrigt wahrscheinlich

den Variationskoeffizienten der VWF:RCo-Bestimmung, indem der VWF-Faktor im Reaktionsmedium stabilisiert wird. Dies erhöht die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testes insbesondere im Bereich der niedrigen ADAMTS-13-Aktivität (<25%). Daraufhin wurde der NHP ab dem 08.04.02 mit hitzeinaktiviertem NHP verdünnt. Für die Herstellung von hitzeinaktiviertem NHP wird das Normalplasma für 30 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend bei 15000g für 15 Minuten zentrifugiert (Biofuge A der Fa. Heraeus-Christ GmbH, Osterode, Deutschland), um die präzipitierten Proteine zu sedimentieren. Der Überstand enthält keine detektierbare ADAMTS-13-Aktivität und wird bis zum Gebrauch in 300 µl Portionen bei -20°C eingefroren.

Das VWF-Konzentrat von LFB Frankreich wird wie unter 2.1. beschrieben gelöst und bis zum Gebrauch in 100 µl Portionen bei -20°C gelagert. Für die Reaktion wird das Substrat bei RT aufgetaut und 1:15 bis 1:18 (abhängig von der Substratcharge) mit Harnstoff-Lösung verdünnt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Qualität des Substrates wird im wesentlichen durch die Inkubationsdauer in der Harnstofflösung bestimmt. Bei langer Inkubation (15- 30 min) kommt es zu einem unspezifischen Verlust von VWF:RCo, welcher die Qualität der ADAMTS-13 Bestimmung erheblich beeinträchtigt. Nach anfänglicher, variabler Inkubationsdauer, wurde das Substrat ab dem 06.11.2001 für genau 5 Minuten inkubiert, um das Substrat ausreichend lange zu entfalten und gleichzeitig einen unspezifischen Verlust von VWF:RCo zu vermeiden.

Die Probe wurde anfangs nach Zugabe des Substrates und vor Messung der VWF:RCo mittels eines Schüttelgerätes (REAX 2000 von Heidolph Elektro GmbH&Co KG, Kelkheim, Deutschland) gemischt. Später wurde beobachtet, dass es bei dem wiederholten Schütteln ebenfalls zu einem unspezifischen Verlust der VWF:RCo kommt. Daraufhin wurden die Proben ab dem 07.10.02 nicht mehr maschinell geschüttelt, sondern nach Zugabe des Substrates und vor Messung der VWF:RCo manuell gemischt, indem der Probenständer für 10 Sekunden vorsichtig hin und her bewegt wurde.

Nach der Entfaltung des VWF-Substrates werden 100 µl der Substrat-Lösung zu der aktivierten Testprobe zugegeben. Es ergibt sich eine Substratendkonzentration im Reaktionsmedium von 1,9 bis 2,2 U/ml. Die letztendliche Plasmaverdünnung im Reaktionsmedium beträgt 1:30,5. Die Testproben werden anschließend über Nacht (14-20 h) bei 37°C inkubiert.

b.) Bestimmung der verbleibenden VWF:RCo im Reaktionsmedium

Grundlagen:

Die Ristocetin-Kofaktoraktivität des Von Willebrand Faktors (VWF:RCo) bezeichnet die Fähigkeit des VWF-Moleküls, in Gegenwart von Ristocetin Thrombozyten zu agglutinieren. Ristocetin ist ein Antibiotikum, welches 1960 vom Markt genommen wurde, da die Ristocetin-Gabe ein Thrombozytopenie verursachte [Gangarosa et al. 1960]. 11 Jahre später

entdeckte Howard and Firkin [1971], dass Ristocetin in Gegenwart von VWF in vitro eine makroskopisch detektierbare Agglutination von Thrombozyten verursacht. Der zugrundeliegende, molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Matsushita und Sadler [1995] haben entdeckt, dass Ristocetin an eine Prolin-reiche Region in der A1-Domäne bindet. Diese Bindung setzt wahrscheinlich ein Bindungsepitop für den Glykoprotein Ib α -Rezeptor frei. Daneben wird vermutet, dass Ristocetin an Thrombozyten bindet und dadurch deren Oberflächenspannung erniedrigt, wodurch eine Bindung des Von Willebrand Faktors an die thrombozytären Rezeptoren ermöglicht werden könnte [Turecek et al. 2001].

Da das Ausmaß der Thrombozytenagglutination mit der Aktivität des Von Willebrand Faktors in der Testprobe korreliert, kann dieser Mechanismus ausgenutzt werden, um die VWF-Aktivität in einer beliebigen Plasmaprobe zu quantifizieren. Die Bestimmung der VWF:RCo ist gegenwärtig der meist angewendete Test zur Bestimmung der funktionalen Aktivität des VWF-Moleküls [Turecek et al. 2001]. Dazu werden dem Testplasma in der Regel Formalin oder Formaldehyd-fixierte Thrombozyten und Ristocetin zugegeben und das Ausmaß der Thrombozyten-Agglutination mittels eines Aggregometers oder eines Gerinnungsautomaten gemessen [Favaloro 1999; Turecek et al. 2001; Dade Behring 2001a+b]. Dade Behring GmbH (Marburg, Deutschland) hat ein gebrauchsfertiges langzeitstabiles Ristocetin-Kofaktor Testreagenz zur routinemäßigen und automatisierten Bestimmung der VWF:RCo (BC Von Willebrand Reagenz) auf einem Gerinnungsautomaten (Behring Coagulation System, BCS oder Behring Coagulation Timer, BCT von Dade Behring GmbH, Deutschland, Marburg) entwickelt (Dade Behring GmbH 2001a+b). Dieses BC Von Willebrand Reagenz hat weltweite Anwendung gefunden, da der Test sehr einfach und schnell durchführbar ist und, im Vergleich zu der VWF:RCo-Bestimmung am Aggregometer, eine bessere Reproduzierbarkeit aufweist. Das BC Von Willebrand Reagenz enthält stabilisierte Thrombozyten (ca. 600000/ μ l), Ristocetin (1,9 mg/ml) und EDTA in lyophilisierter Form (Dade Behring GmbH 2001a+b). Das Reagenz wird vor Gebrauch in 4 ml destillierten H₂O gelöst. Der Gerinnungsautomat pipettiert automatisch folgenden Reaktionsansatz:

40 μ l Probe
+ 280 μ l Imidazolpuffer
+ 150 μ l BC Von Willebrand Reagenz

Dieses Testschema wird gemeinhin als „VWF:RCo-high“ bezeichnet, da es für Proben mit hoher oder normaler VWF-Aktivität angewendet wird. Für Proben mit einer geringen Konzentration von VWF:RCo werden die Proben statt 1:8 nur 1:1 mit Imidazolpuffer verdünnt. Dieses Testschema wird als „VWF:RCo-low“ bezeichnet.

Nach einer lag Phase von 10 Sekunden misst der Gerinnungsautomat in den darauffolgenden 80 Sekunden die Veränderung der optischen Dichte, welche durch die ablaufende Agglutination der im Reagenz enthaltenen Thrombozyten verursacht wird. Die Rohwerte in

milli-Extinktionen pro Minute (mE/min) werden von dem Gerinnungsautomaten anhand der gespeicherten Eichkurve automatisch in VWF:RCo in % der Norm umgerechnet.

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

BC Von Willebrand Reagenz von Dade Behring GmbH, Deutschland, Marburg

Imidazolpuffer von Baxter AG, Wien, Österreich

Durchführung:

Der ADAMTS-13 Reaktionsansatz wird nach der entsprechenden Inkubation (s.o.) direkt für die Bestimmung der verbleibenden VWF:RCo eingesetzt. Die Reaktion wird nicht durch Zugabe von EDTA gestoppt, da EDTA die VWF-vermittelte Agglutination der Thrombozyten inhibiert. Das BC Von Willebrand Reagenz wird gemäß der Instruktionen des Herstellers (Dade Behring GmbH 2001a) in 4 ml destilliertem H₂O gelöst, mit einem Magnetrührer versehen und in die entsprechende Reagenzposition im BCT-Gerinnungsautomaten (Dade Behring GmbH, Deutschland, Marburg) gestellt. Der BCT wird des weiteren mit Imidazolpuffer und den Testproben bestückt. Der BCT misst 40 Proben in ca. 60 Minuten. Diese schnelle Messung erlaubt eine hohe Probenanzahl in einem Testlauf ohne dass die ADAMTS-13 Reaktion vorher gestoppt werden müsste, da bei einer Gesamtreaktionszeit von 14-20 Stunden die zeitliche Verzögerung der VWF:RCo-Bestimmung von maximal 60 Minuten zu vernachlässigen ist.

Die verbleibende VWF:RCo des zugegebenen Substrates korreliert mit der ADAMTS-13-Aktivität im Testmedium. Anhand der mitgeführten, seriellen Verdünnungen des humanen Normalplasmapools (200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% und 6,25%) wird jeder Testdurchlauf kalibriert. Der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und verbleibender VWF:RCo wird durch folgende Gleichung beschrieben: $y=A+(D-A)/(1+e^{(B \cdot (c-x))})$ (Auswertung mit Easy fit software, Version 5.14 von Tecan, Basel, Schweiz). Anhand der jeweiligen Kalibrationskurve (siehe Abb. 16) wird die ADAMTS-13-Aktivität der Testproben berechnet (Easy fit software, Version 5.14 von Tecan, Basel, Schweiz). Die VWF:RCo-Messung erlaubt somit eine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität.

Initial erfolgte die Auswertung mittels der Prozentwerte für die VWF:RCo. Dies erforderte eine unterschiedliches Pipettierschema für die Proben mit hoher und niedriger VWF:RCo, da die Eichgerade für das Testschema VWF:RCo-low (s.o.) die Quantifizierung der VWF-Aktivität nur im Bereich zwischen 5-130% erlauben und die Eichgerade für das Testschema VWF:RCo-high (s.o.) nur im Bereich zwischen 40-365% anwendbar ist. In der Regel erfolgte die VWF:RCo-Bestimmung nach dem Testschema für Proben mit niedrigem VWF-Gehalt (VWF:RCo-low). Wenn die Proben nach diesem Testschema eine VWR:RCo >130% aufwiesen, wurde die Messung mit dem Testschema VWF:RCo-high wiederholt. Demnach wurden innerhalb einer typischen ADAMTS-13-Kalibrationsreihe zwei unterschiedliche

Pipettierschemata angewendet. Dies verursachte eine hohe Variabilität innerhalb der Kalibrationsreihe. Um diese fehlende Standardisierung der RCo-Bestimmung zu umgehen, erfolgte die Quantifizierung der VWF:RCo später (ab dem 19.11.2002, siehe Kapitel 4.1.2.) mittels der Rohdaten, d.h. der Extinktionsänderung pro Minute (mE/min) nach Zugabe des BC Von Willebrand Reagenzes (s.o.). Die Verwendung der Rohdaten hat zwei sehr wesentliche Vorteile:

- Die Bestimmung der VWF:RCo erfolgt für alle Proben eines Testdurchlaufes mit dem gleichen Pipettierschema (VWF:RCo-low).
- Die Verwendung der Rohdaten vermeidet die Anwendung der, im Gerinnungs-Automaten gespeicherten, Eichkurve.

Dies erhöhte die Standardisierung der Testbedingungen und erniedrigte damit die Variabilität der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung. Die Umrechnung der Rohdaten mittels der gespeicherten Eichgerade erhöht die Variabilität der ADAMTS-13 Ergebnisse, da es sich nicht um eine lineare Eichgerade, sondern um eine Punkt zu Punkt-Kalibration handelt. Der Umrechnungsfaktor ist demnach nicht für alle Rohdaten identisch, sondern variiert mit der gegebenen VWF-Aktivität.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen beispielhaft die Erstellung der ADAMTS-13-Kalibrationsreihen desselben Testes mittels der Werte in Prozent der Norm (Abb. 15) und mittels der Rohdaten in mE/min (Abb. 16). Die Abbildungen verdeutlichen, dass die Rohdaten den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und verbleibender VWF:RCo exakter darstellen als die VWF:RCo-Werte in Prozent.

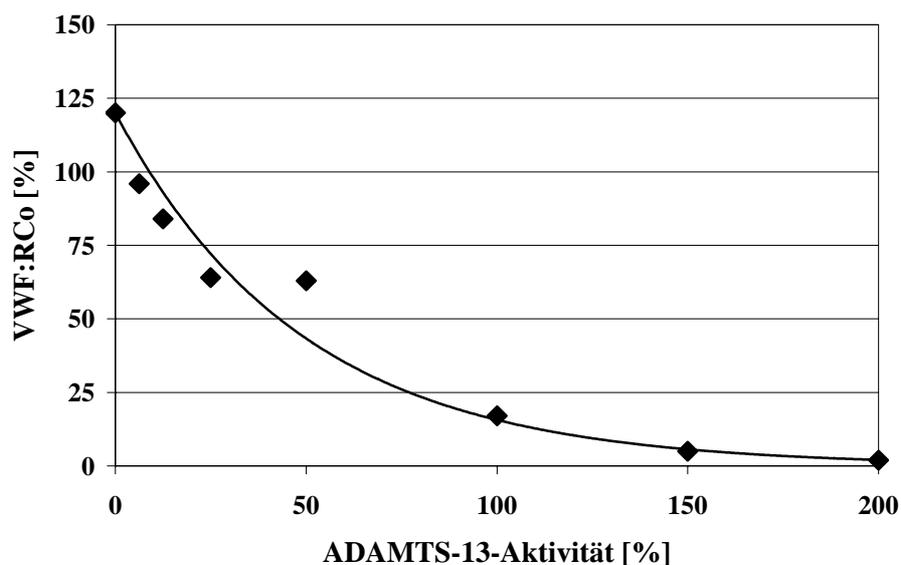


Abbildung 15: Kalibrationskurve bei Verwendung der VWF:RCo-Werte in Prozent

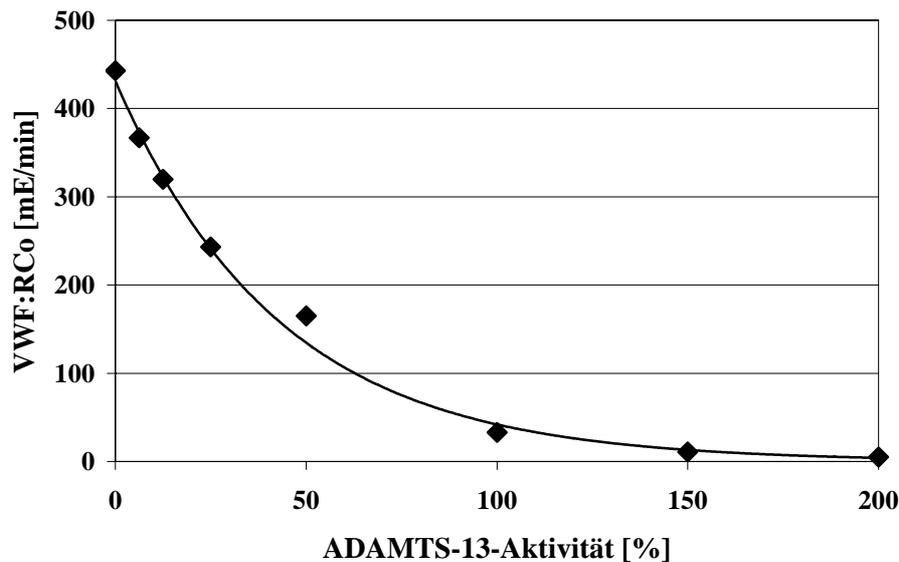


Abbildung 16: Kalibrationskurve bei Verwendung der VWF:RCo-Werte in mE/min

2.6. Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 erfolgt gemäß der sogenannten Bethesda-Methode [Kaspar 1991]. Dabei wird das Testplasma mit Normalplasma gemischt und nach Inkubation die verbleibende Aktivität des zu untersuchenden Gerinnungsfaktors bestimmt. Bei einer positiven inhibitorischen Aktivität im Testplasma kommt es während dieser Inkubation zu einer Inaktivierung des zu untersuchenden Gerinnungsfaktors.

Durchführung:

Das Testplasma wird, unverdünnt oder verdünnt mit hitzenaktiviertem NHP (Kap. 2.5.), zu gleichen Teilen mit NHP (Kap. 2.1.) gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Referenzprobe wird NHP zu gleichen Teilen mit hitzeinaktiviertem NHP gemischt und analog zur Probe weiterbehandelt. Nach der Inkubation erfolgt die Bestimmung der verbleibenden ADAMTS-13-Aktivität mittels der RCo-Methode (Kap. 2.5.). Anschließend wird die ADAMTS-13-Restaktivität anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{ADAMTS-13-Restaktivität [\%]} = \frac{\text{ADAMTS-13-Aktivität der Probe} \cdot 100}{\text{ADAMTS-13-Aktivität der Referenzprobe}}$$

Eine Testprobe enthält keinen Inhibitor, wenn die ADAMTS-13-Aktivität der Probe gleich dem der Referenzprobe ist, d.h. deren ADAMTS-13 Restaktivität 100% (oder >100%) beträgt. Bei einer ADAMTS-13-Restaktivität von <75% wird die inhibitorische Aktivität gemäß der Bethesda-Methode [Kaspar 1991] quantifiziert. Nach Kaspar [1991] enthält eine Testprobe mit einer Restaktivität von 50% im dargestellten Inhibitortest definitionsgemäß

einen 1 Unit (U) Inhibitor/ml. Der Zusammenhang zwischen Restaktivität und Inhibitortiter wird durch folgende Formel beschrieben:

$$\text{ADAMTS-13-Inhibitortiter [U/ml]} = \frac{2 - \log(\text{ADAMTS-13-Restaktivität})}{0,30103}$$

Die Quantifizierung erfolgt nur für Proben mit einer Restaktivität zwischen 25 und 75%. Der so berechnete Inhibitortiter wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor des Testplasmas multipliziert. Beträgt die Restaktivität für mehrere Proben der Verdünnungsreihe zwischen 25 und 75%, wird der Mittelwert aus den einzelnen Ergebnissen angegeben. Beträgt die Restaktivität >75% beträgt die inhibitorische Aktivität definitionsgemäß <0,4 U/ml.

Plasmaproben mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität (>6,25%) werden vor dem Inhibitor-Test hitzeinaktiviert. Dazu werden die Proben 30 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend bei 15000g für 15 Minuten zentrifugiert (Biofuge A der Fa. Heraeus-Christ GmbH, Osterode, Deutschland), um die präzipitierten Proteine zu sedimentieren. Der Überstand enthält keine detektierbare ADAMTS-13-Aktivität und wird für den Inhibitor-Test verwendet. Um sicherzustellen, dass der Inhibitor durch die Hitzeinaktivierung und anschließende Zentrifugation nicht inaktiviert bzw. präzipitiert wird, erfolgte der Inhibitortest für ausgewählte Inhibitor-positive Proben (n=4) parallel mit Plasma ohne bzw. mit vorhergehender Hitzeinaktivierung. Die Ergebnisse zeigten, dass die Hitzeinaktivierung bei den getesteten Stichproben keinen Einfluss auf den Inhibitortiter hat. Demzufolge wurde angenommen, dass sich generell ein Hitze-bedingter Verlust von inhibitorischer Aktivität gegen ADAMTS-13 ausschließen lässt.

2.7. Bestimmung des VWF:Antigens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Studien durchgeführt, welche den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF-Gehalt im Plasma behandeln. Der VWF wird üblicherweise immunologisch mittels polyklonaler Antikörper nachgewiesen (VWF:Antigen). Hier wurde der VWF mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) quantifiziert. Bei der ELISA-Technik wird der für das betreffende Protein spezifische Antikörper an eine polymere Matrix, z.B. eine Polyvinylchloridplatte, gebunden. Nach Zugabe der Testprobe wird das Protein durch Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen an die Festphase gebunden. Anschließend wird die Platte gewaschen und ein sekundärer Antikörper gegen das betreffende Protein zugegeben. Dieser sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym, üblicherweise der alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-Peroxidase, konjugiert. Nachdem man den überschüssigen Antikörper von der Platte gewaschen hat, wird die gebundene Enzymaktivität durch eine Farbreaktion quantitativ bestimmt. Die Umsetzung des Substrates ist unter den gegebenen Bedingungen proportional zum Antigengehalt in der Testprobe.

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

Carbonatpuffer: 50 mmol/l Na₂CO₃, 50 mmol/l NaHCO₃, pH 9,6

Waschpuffer: 150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l TRIS, 1% Rinderserumalbumin (BSA), pH 7,4 mit 5 mol/l HCl

Probenpuffer: 150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l TRIS, 3 % BSA, pH 7,4 mit 5 mol/l HCl

Primärer Antikörper: „Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor P 0082“ von Dako A/S, Glostrup, Dänemark

Sekundärer Antikörper: „Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor A 0226“ von Dako A/S, Glostrup, Dänemark

Schwefelsäure (H₂SO₄): 3 mol/l

Wasserstoffperoxid (H₂O₂): 30%ig

1,2-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD) von Dako A/S, Glostrup, Dänemark

Durchführung:

Bei dem hier durchgeführten VWF:Ag ELISA wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit dem primären Kaninchen-Antikörper (A 0082) beschichtet. Dazu wird die Antikörperlösung 1:500 mit Carbonatpuffer verdünnt und jeweils 100 µl der Lösung in jede Vertiefung einer 96er stark bindenden Mikrotiterplatte („Nunc-ImmunoTM Plate, MaxiSorpTM Surface“ von Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) gegeben. Die Platte wird zur Bindung des Antikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der nicht gebundene Antikörper entfernt, indem jede Vertiefung 3 mal mit 250 µl Waschpuffer ausgespült wird. Dieser Waschschrift erfolgt maschinell mit einem Waschgerät von Tecan Ges.m.b.H., Grödig, Österreich (Columbus Wascher).

Anschließend wird die Mikrotiterplatte mit einer hochprozentigen Proteinlösung geblockt, d.h. die freien Bindungsstellen werden mit Proteinen besetzt, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Dazu werden jeweils 100 µl Probenpuffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte 1 h bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platte wie oben beschrieben gewaschen wurde, werden pro Vertiefung 100 µl der verdünnten Testprobe aufgetragen.

Die Proben werden in der Regel 1:40 mit Probenpuffer verdünnt. Proben mit niedrigem VWF-Gehalt (<30%) werden 1:20 und Proben mit hohem VWF-Gehalt (>400%) werden 1:80 mit Probenpuffer verdünnt. Für die Kalibration des Testes wird eine Verdünnungsreihe mit NHP (Kap. 2.1.) erstellt. Dazu wird der NHP so verdünnt, dass die verdünnten Proben jeweils 400%, 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% und 6,25% VWF:Ag enthalten (NHP in der 1:40 Verdünnung enthält definitionsgemäß 100% VWF:Ag).

Nach Zugabe der Proben wird die Platte 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird 1:500 mit Probenpuffer verdünnt und anschließend auf die Platte appliziert (100 µl pro Vertiefung). Die Platte wird 2 weitere Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen.

Für die anschließende Farbreaktion werden 2 mg OPD in 11 ml dest. H₂O gelöst und 100 µl einer 30%igen H₂O₂-Lösung hinzugegeben. Nach Zugabe von 100 µl dieser Substrat-Lösung pro Vertiefung wird die Platte für 8 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 50 µl 3 mol/l Schwefelsäure gestoppt.

Es folgt die photometrische Messung bei 492 nm mit einem ELISA-Photometer von SLT-Labinstruments Ges.m.b.H., Grödig, Österreich (Easy Reader 400 Terminal Reader). Die Standardkurve wird durch eine Gleichung folgenden Types beschrieben: $y=A+(D-A)/(1+e^{(B \cdot (c-\ln x))})$ (Auswertung mit „Easy Fit Software“, Version 5.14 von Tecan, Basel, Schweiz). Der VWF-Gehalt in den Testproben wird anhand der Kalibrationskurve automatisch von der „Easy Fit Software“, Version 5.14 berechnet.

2.8. Molekulargenetische Untersuchungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das ADAMTS13-Gen einer Patientin mit rezidivierenden Schlaganfällen analysiert (Kap. 4.5.). Dazu wurden alle 29 Exons mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend sequenziert. Die DNA-Isolation, Amplifikation und Sequenzierung wurde von Dr. Antoine und Dr. Scheiflinger im Labor von Baxter BioScience in Orth, Österreich durchgeführt.

Für die DNA-Analyse werden 10 ml EDTA-Blut 15 Minuten bei 2500g zentrifugiert, um Leukozyten von Erythrozyten und Plasma zu trennen. Die Leukozyten-angereicherte Fraktion („Buffy Coat“) wurde anschließend entnommen und 1:1 mit TEN-Puffer (50 mmol/l TRIS, 100 mmol/l EDTA, 50 mmol/l NaCl, pH 8 mit 5 mol/l HCl) verdünnt. Die zu untersuchende Probe wurde bei -20°C eingefroren und auf Trockeneis zu Baxter BioScience in Orth, Österreich geschickt. Dort erfolgte die Isolation der genomischen DNA mit dem „QIAamp DNA Blood Kit“ von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland gemäß den Instruktionen des Herstellers. Die PCR-Amplifikation der 29 ADAMTS13-Exons werden mit einer Hitze-aktivierten Polymerase (HotStar Taq Polymerase von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß publizierter Methodik [Antoine et al. 2003; Plaimauer et al. 2002] durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte nach den Instruktionen des Herstellers mit den „QIAquick PCR purification kit“ von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland gereinigt. Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgt mit dem „Big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit“ von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland unter Verwendung der jeweiligen PCR-Primer in einem Sequenzer von Applied Biosystems, Foster City, USA (Modell 373A) [Antoine et al. 2003; Plaimauer et al. 2002].

2.9. Erhebung sonstiger Daten

Die Bestimmung folgender Parameter erfolgte gemäß gebräuchlicher Standardmethoden:

- Thromboplastinzeit (TPZ)
- Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT)
- Konzentration von Fibrinogen im Plasma (Fib)
- Konzentration von D-Dimeren im Plasma (D-Dimere)
- Konzentration von Lactat-Dehydrogenase im Heparinplasma (LDH)
- Konzentration vom C-reaktivem Protein im Heparin (CRP)
- Konzentration von Hämoglobin im EDTA-Blut (Hb)
- Anzahl der Thrombozyten im EDTA-Blut (Thr)
- Nachweis von Fragmentozyten im EDTA-Blutausstrich

Alle relevanten klinischen Daten wurden den stationären und ambulanten Krankenblättern entnommen. Dabei wurden insbesondere folgende Daten aufgezeichnet:

- klinische Diagnose
- Therapie
- klinischer Verlauf
- Alter der Erstmanifestation
- Rezidivhäufigkeit
- potentielle Auslöse- und Risikofaktoren
- familiäre Disposition.

2.10. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „BIAS“, Version 7.0 von Dr. H. Ackermann, Abteilung für Biomathematik, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main.

Um zwei Datengruppen miteinander zu vergleichen wurde für normal verteilte Parameter der parametrische Zweistichproben t-Test und für nicht-normal verteilte Parameter der nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test angewendet. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass die Unterschiede zwischen den Datengruppen „per Zufall“ entstanden sind. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird die Nullhypothese (= kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen) abgelehnt.

Um den Zusammenhang zwischen zwei Parametern zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Normal verteilte Parameter wurden mittels der parametrischen Pearson-Korrelation und nicht-normal verteilte Parameter mittels der nicht-parametrischen Spearman-Rang Korrelation analysiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit

von $p < 0,05$ wird ein signifikanter Zusammenhang zwischen den getesteten Parametern angenommen. Der Korrelationskoeffizient rho (r) ist ein Maß für die Richtung und die Enge des Zusammenhanges. Ist $r < 0$ handelt es sich um eine negative Korrelation, ist $r > 0$ besteht ein positiver Zusammenhang. Aus dem Korrelationskoeffizienten lässt sich das Bestimmtheitsmaß B berechnen ($B = R^2 \cdot 100$). B bezeichnet den prozentualen Anteil der Gesamtvariabilität des einen Parameters, welche durch den zweiten Parameter erklärt werden kann.

Für den Test auf Gauß-Verteilung wird der Kolmogoroff-Smirnoff-Lilliefors-Test angewendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p > 0,2$ wird die Nullhypothese (=die Daten entstammen einer Gauß-Verteilung) akzeptiert. Datengruppen mit $p < 0,2$ im Kolmogoroff-Smirnoff-Lilliefors-Test wurden dementsprechend mittels der nicht-parametrischen Statistik analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse zur Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Immunoblotting-Methode nach Furlan et al. (Kap. 1.5.1.) zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mit Modifikationen im Labor der hämostaseologischen Ambulanz etabliert. Anschließend wurde ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität entwickelt, bei welchem die Enzymaktivität durch Bestimmung der verbleibenden VWF:Ristocetin-Kofaktor-Aktivität (VWF:RCo) des Substrates quantifiziert wird (RCo-Methode). Die relevanten Resultate zur Methoden-Entwicklung und Optimierung werden für die Immunoblotting-Methode im Kapitel 3.1.1. und für die RCo-Methode im Kapitel 3.1.2. dargestellt. Im Kapitel 3.1.3. folgt ein Vergleich der beiden Verfahren. Das Kapitel 3.1.4. beschreibt die Ergebnisse einer internationalen Multicenterstudie, in welcher die Richtigkeit der entwickelten RCo-Methode getestet wurde.

3.1.1. Die Immunoblotting-Methode

Die Immunoblotting-Methode erfolgte im wesentlichen nach Furlan et al. [1996] mit den im Kapitel 2.4. dargestellten Modifikationen. Die Abbildung 17 zeigt beispielhaft eine typische ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung durch die Immunoblotting-Methode. Die Kalibration des Testes erfolgte, wie in Kapitel 2.4. beschrieben, durch Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität in verschiedenen Verdünnungen des normalen, humanen Plasmapools.

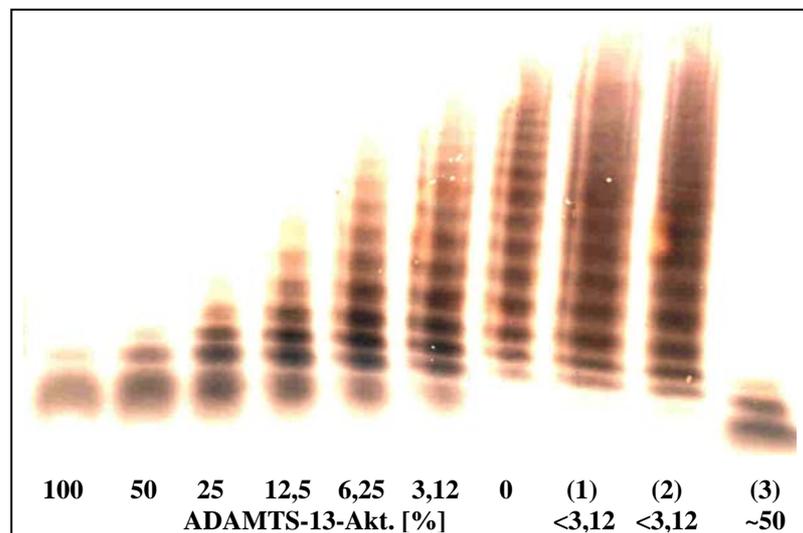


Abbildung 17: Beispielhafte Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mit der Immunoblotting-Methode nach Furlan et al. [1996]

Für die Kalibration wurde in diesem Test Imidazolpuffer verwendet und die SDS-AGE erfolgte mit SeaKem-Agarose. Die Proteolyse des VWF-Substrates durch ADAMTS-13 führt zu einer dosisabhängigem Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere. Für die Kalibration (Spalten 1-7) wurde das Normalplasma 1:5 (100%), 1:10 (50%), 1:20 (25%), 1:40 (12,5%) und 1:80 (6,25%) mit Reaktionspuffer verdünnt. Für den 0% Wert wurde die Reaktion mit Puffer durchgeführt. Die Spalten (1) bis (3) zeigen Plasmaproben in einer 1:5 Verdünnung von TTP-Patienten vor (1-2) und während der Plasmapheresetherapie (3).

Die Immunoblotting-Methode erlaubt ohne densitometrische Auswertung keine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität. Die ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Plasmaproben wurden durch visuellen Vergleich mit der Eichung des jeweiligen Testes semi-quantitativ in folgende Kategorien eingeteilt:

- > 50%
- 25 – 50 %
- 12,5 – 25 %
- 6,25 – 12,5 %
- < 6,25 %

Von September 2000 bis Oktober 2001 wurde das Normalplasma für die Kalibration des Testes nur von 1:5 bis 1:80 verdünnt, d.h. die Sensitivitätsgrenze lag dementsprechend bei 12,5%.

Die durch die Immunoblotting-Methode detektierte VWF-Proteolyse wird vollständig durch 150 mM NaCl im Reaktionsmedium gehemmt (Gel nicht abgebildet). Des weiteren erfolgt kein detektierbarer VWF-Abbau ohne Harnstoff (Gel nicht abgebildet). Der Abbau des VWF-Substrates wird vollständig durch 1 mM EDTA inhibiert (Abb. 18). Ohne Zugabe von zweiwertigen Kationen erniedrigt sich die ADAMTS-13-Aktivität auf 25-50% (Abb. 18).

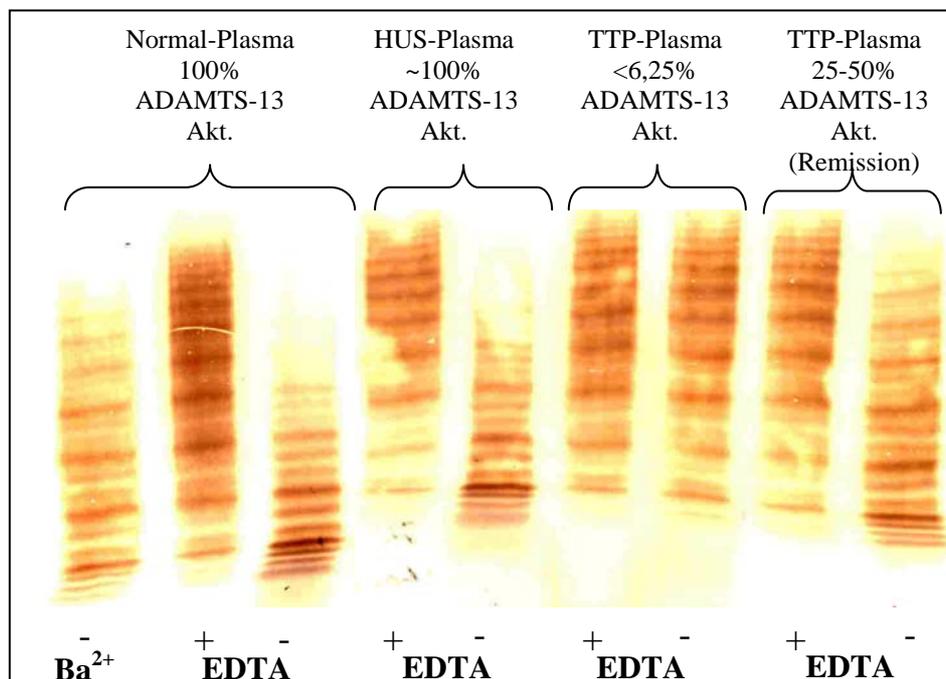


Abbildung 18: Der Effekt von EDTA und BaCl₂ auf die ADAMTS-13-katalysierte Proteolyse des Von Willebrand Faktors

In diesem Test wurden die Proben 1:10 (statt der üblichen 1:5 Verdünnung) mit Reaktionspuffer ohne EDTA (-EDTA) und Reaktionspuffer mit 1,5 mmol/l EDTA verdünnt (+EDTA) verdünnt. Die Aktivierung von ADAMTS-13 erfolgte durch Zugabe von 1 µl einer 1 mol/l BaCl₂-Lösung zu 100 µl verdünntem Plasma und anschließender 5 minütigen Inkubation bei 37°C. Für die Bestimmung der VWF-Proteolyse ohne Bariumionen (-BaCl₂) wurde die BaCl₂-Lösung durch H₂O ersetzt. Die SDS-AGE erfolgte mit TypVII-Agarose.

Da die VWF-Proteolyse bei der Immunoblotting-Methode üblicherweise auf einer Dialysemembran erfolgt [Kap. 1.5.1.], wurde die Aktivitätsbestimmung für 3 Proben parallel auf einer Dialysemembran und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Da sich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen bei der Reaktion auf der Dialysemembran keine signifikante Erhöhung der VWF-Proteolyse zeigte, wurde die Reaktion routinemäßig in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Eine beispielhafte Kinetik der, durch die Immunoblotting-Methode detektierten, ADAMTS-13-Aktivität ist im Kapitel 3.1.2. (Abb. 20) dargestellt.

Für die Erstellung des Normbereiches wurde die ADAMTS-13-Aktivität mittels der Immunoblotting-Methode bei 80 gesunden Probanden (Normalkollektiv I, Kap. 2.2.1.) bestimmt. Die Abbildung 19 zeigt beispielhaft die ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung von 14 gesunden Probanden. Alle getesteten Normalpersonen präsentierten eine ADAMTS-13-Aktivität von > 50%. Bei den getesteten Personen zeigten sich für die ADAMTS-13-Aktivität keine geschlechtspezifischen Unterschiede.

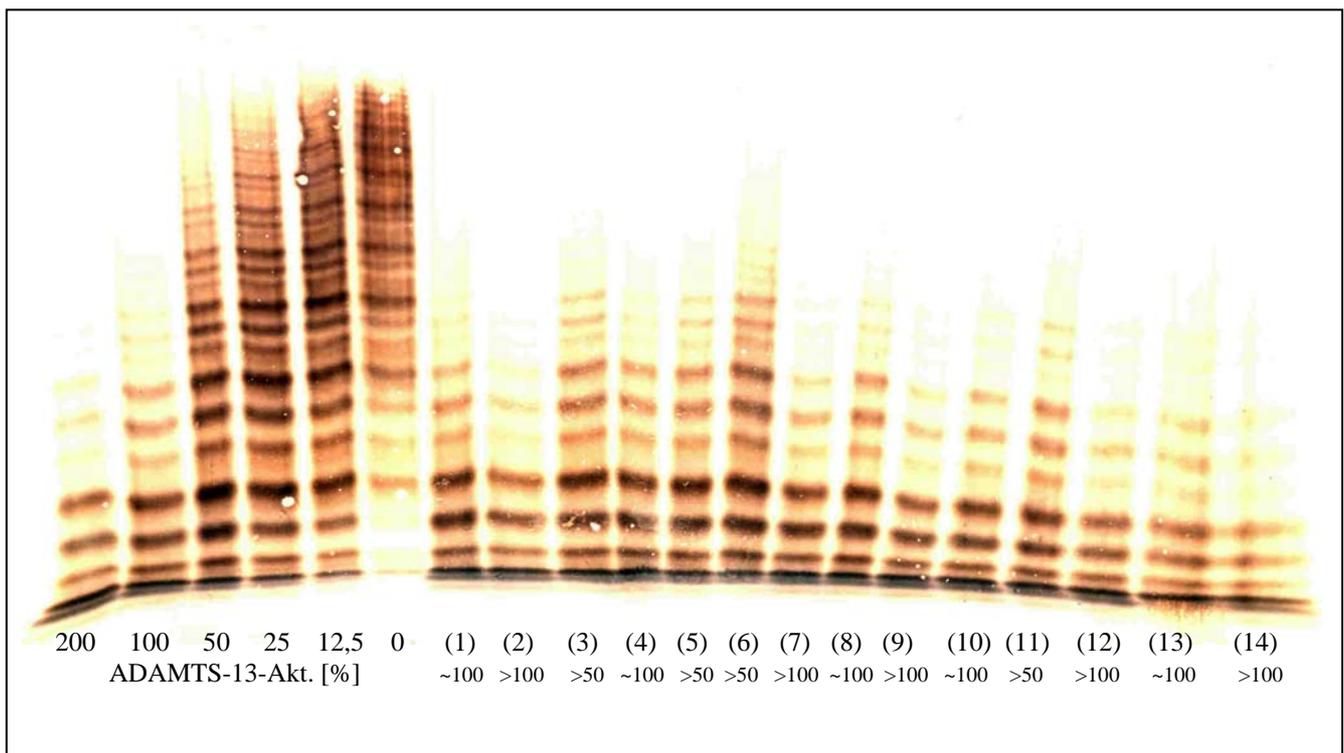


Abbildung 19: Ein exemplarischer Test zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität bei Normalpersonen

(1) – (14): ADAMTS-13-Aktivität von 14 weiblichen Probanden des Normalkollektivs I (Kap. 2.2.1.).

Für die Kalibration wurde Imidazolpuffer verwendet und die SDS-AGE erfolgte mit Sigma-Agarose.

3.1.2. VWF:RCo-Methode

Die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des Von Willebrand Faktors (VWF:RCo) wird im wesentlichen durch den Anteil der hochmolekularen VWF-Multimere bestimmt (Kap. 1.2.2.). Der Abbau des VWF-Substrates durch ADAMTS-13 führt zu einem sukzessiven Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere (Abb. 17). Der ADAMTS-13 katalysierte Abbau des VWF-Substrates lässt sich mit dem unter 2.5. beschriebenen Verfahren sehr sensitiv mit Messung der VWF:RCo des degradierten VWF-Substrates messen. Die Abbildung 20 zeigt den zeitabhängigen Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere mit dem einhergehenden Abfall der VWF:RCo.

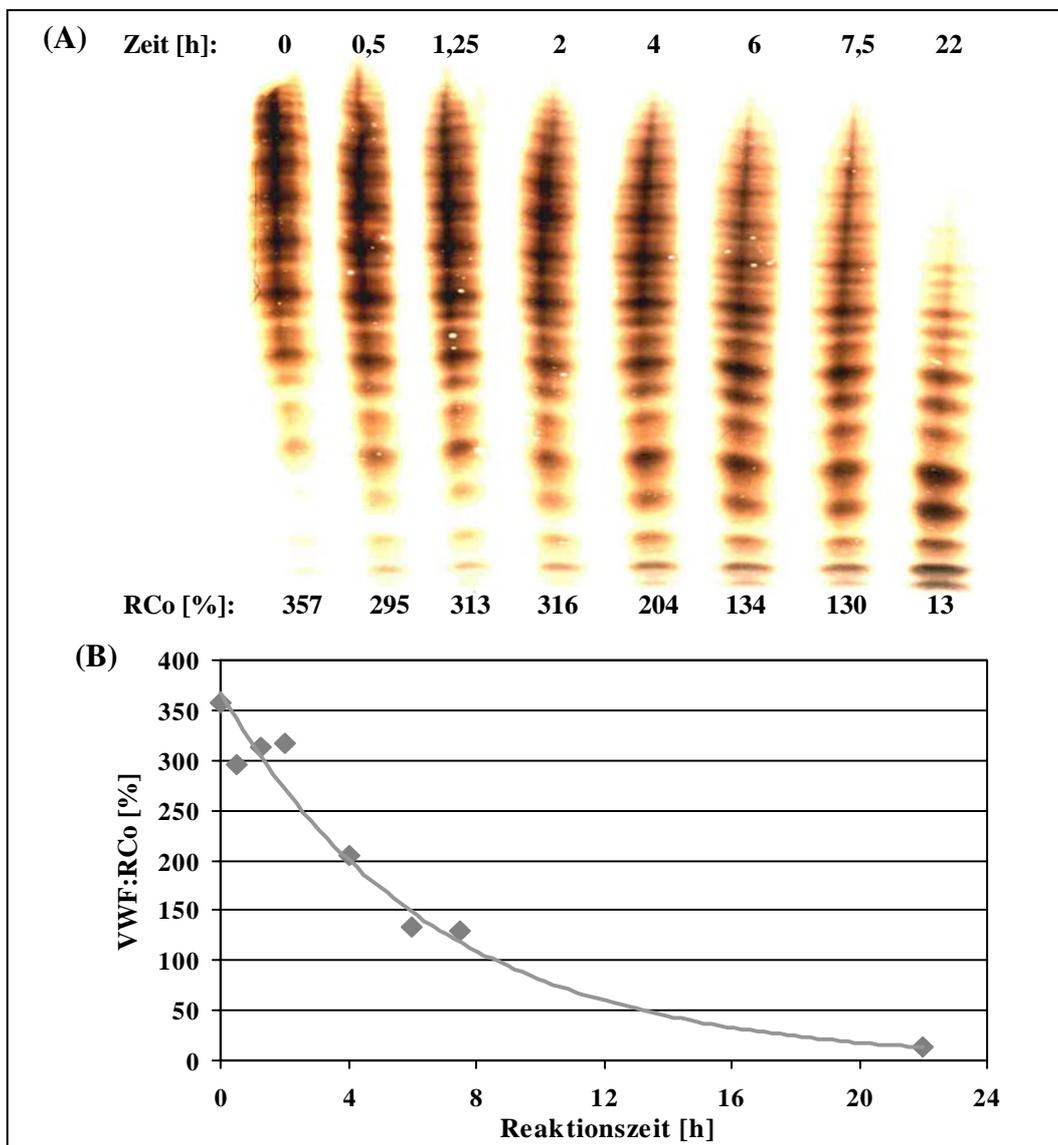


Abbildung 20: Korrelation zwischen Multimerengröße und VWF:RCo des Von Willebrand Faktors im Verlauf der Proteolyse durch ADAMTS-13

Für diesen Test wurde das Normal-Plasma 1:5 mit Reaktionspuffer verdünnt. Nach 0; 0,5; 1,25; 2; 4; 6; 7,5 und 22 Stunden wurde dem Reaktionsansatz eine Probe für die Bestimmung der Multimerenstruktur und der VWF:RCo entnommen. Der Test erfolgte mit einer erhöhten Substratkonzentration von ~ 4 U/ml (statt der üblichen Konzentration von ~ 2 U/ml).

Die Abbildung 21 zeigt die dosisabhängige Erniedrigung der VWF:RCo bei steigender Enzymkonzentration in einer typischen Kalibrationsreihe. Die Abnahme der VWF:RCo, hier dargestellt durch die Abnahme der optischen Dichte (ΔmE), bei steigender Enzymkonzentration wird durch folgende Gleichung beschrieben: $y=A+(D-A)/(1+e^{(B*(c-x))})$ (Auswertung mit Easy fit software, Version 5.14 von Tecan, Basel, Schweiz). Die VWF:RCo-Messung erlaubt somit eine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität, während die Immunoblotting-Methode nur eine semiquantitative Bestimmung in die unter 3.1.1. angegebenen Kategorien zulässt. Für die Kalibration wurde das gepoolte Normalplasma üblicherweise von 1:21 bis 1:336 mit Reaktionspuffer verdünnt. Bei einer Definition der 1:21-Verdünnung als Probe mit 100% ADAMTS-13-Aktivität ergibt sich eine Sensitivitätsgrenze von 6,25%. Für den 200%-Wert wurde das Plasma 1:11 mit Reaktionspuffer verdünnt.

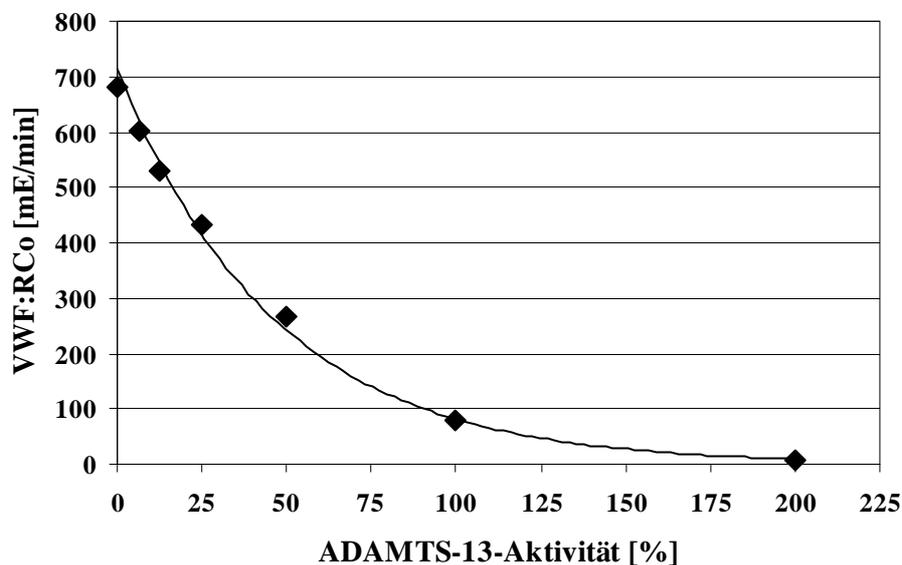


Abbildung 21: Exemplarische Kalibrationskurve der RCo-Methode

Die VWF:RCo wurde bei diesem Test durch die Veränderung der optischen Dichte (ΔmE) wie unter 2.5. beschrieben quantifiziert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Abbildung 22 illustriert beispielhaft die zeit und dosis-abhängige Erniedrigung der VWF:RCo. Die Probe mit hitze-inaktiviertem Plasma (0% ADAMTS-13-Aktivität) zeigte einen zeitabhängigen, unspezifischen Abbau der VWF:RCo um insgesamt 20% nach 30 Stunden Inkubationszeit bei 37°C. Dieser unspezifische Abbau ist klar von dem Enzym-abhängigem Abfall der VWF:RCo in der Probe mit Normalplasma und in der Probe mit 45% ADAMTS-13-Aktivität zu differenzieren. Das TTP-Plasma präsentierte dagegen einen ähnlichen Verlauf wie das hitzeinaktivierte Plasma und zeigte demnach keine detektierbare, enzymatische VWF-Proteolyse.

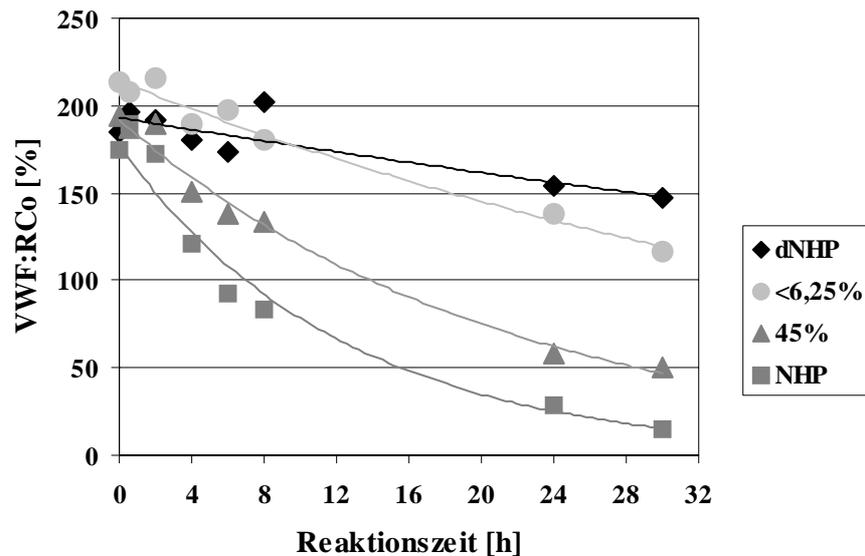


Abbildung 22: Dosis-abhängige Kinetik der VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13

Der Test wurde gemäß Kapitel 2.2. mit der üblichen Substratkonzentration von ~ 2 U/ml durchgeführt. Die Quantifizierung der VWF:RCo erfolgte mittels der prozentualen Werte. Neben dem Normalplasma (NHP) und dem hitze-inaktiviertem Normalplasma (dNHP) wurden 2 Proben von TTP-Patienten mit einem schwerem Proteasemangel (<6,25%) und mildem Proteasemangel (45%) untersucht.

Wie bereits in Kapitel 1.4.1. beschrieben wurde, ist die ADAMTS-13-Aktivität stark von der Pufferkonzentration abhängig. Um den Einfluss der TRIS-Konzentration in dem entwickelten Verfahren zu bestimmen, wurde Normalplasma mit Puffern unterschiedlicher Molarität verdünnt. Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen eine Hemmung der ADAMTS-13-Aktivität bei einer Pufferkonzentration > 20 mM TRIS.

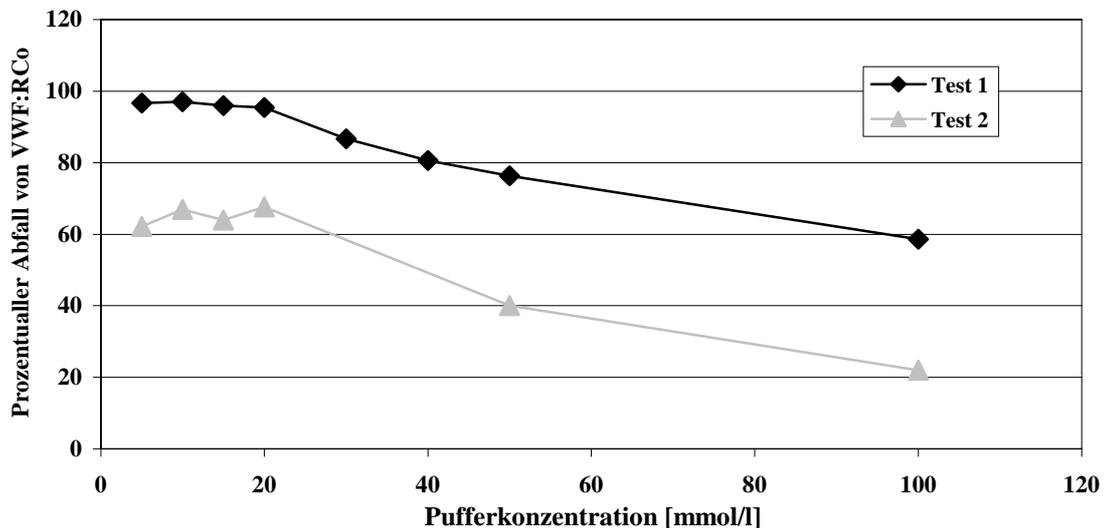


Abbildung 23: Einfluss der Pufferkonzentration auf die ADAMTS-13-Aktivität

Um den Einfluss der Pufferkonzentration zu testen, wurden in zwei unabhängigen Experimenten NHP und hitzeinaktiviertes NHP (dNHP) mit 5-100 mM TRIS, pH 8 inklusive 12,5 mM BaCl₂ verdünnt und, wie im Kapitel 2.5. beschrieben, mit VWF-Substrat versetzt und nach entsprechender Inkubation die VWF:RCo bestimmt. Die Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität erfolgte durch Angabe des prozentualen Abfalles der VWF:RCo in der Probe mit NHP verglichen zur Probe mit dNHP ($(VWF:RCO_{NHP} - VWF:RCO_{dNHP}) / VWF:RCO_{dNHP} \cdot 100$).

Die entwickelte RCo-Methode wurde wie in Kapitel 2.5. beschrieben optimiert. Im wesentlichen wurden zwischen Juli 2001 und Juli 2003 folgende Verbesserungen eingeführt:

- I. Der anfangs verwendete Puffer (5 mmol/l TRIS-Puffer oder Imidazolpuffer) für die serielle Verdünnung des Normalplasmas wurde ab dem 08.04.02 durch hitzeinaktiviertes Normalplasma ersetzt. Die Verwendung von hitzeinaktiviertem Plasma erniedrigt den Variationskoeffizienten der VWF:RCo-Bestimmung innerhalb der Kalibrationsreihe, indem die VWF:RCo im Reaktionsmedium stabilisiert wird. Dies erhöht die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Testes, insbesondere im Bereich der niedrigen ADAMTS-13-Aktivität (<25%).
- II. Die Probe wurde anfangs nach Zugabe des Substrates und vor Messung der VWF:RCo mittels eines Schüttelgerätes gemischt. Später wurde beobachtet, dass es bei dem wiederholten Schütteln zu einem unspezifischen Verlust der VWF:RCo kommt. Wahrscheinlich kommt es dabei zu einem nicht enzymatischen Bruch der entfalteten Multimere. Daraufhin wurden die Proben ab dem 07.10.02 nicht mehr maschinell geschüttelt, sondern nach Zugabe des Substrates und vor Messung der VWF:RCo manuell gemischt, indem der Probenständer für 10 Sekunden vorsichtig hin und her bewegt wurde.
- III. Die Messung der VWF:RCo erfolgt im automatisierten Gerinnungsautomaten (BCT, Dade Behring). Dabei wird der Abfall der optischen Dichte in ΔmE automatisch anhand der im BCT gespeicherten Eichgerade in die prozentuale VWF:RCo umgerechnet. Die VWF:RCo in % wurde anfangs verwendet, um die ADAMTS-13-Aktivität zu berechnen. Später wurde entdeckt, dass bei Verwendung der Rohdaten (ΔmE) die Variabilität der Ergebnisse erheblich herabgesetzt werden kann. Nachdem durch parallele Auswertung mittels der VWF:RCo in % und der VWF:RCo in ΔmE sichergestellt wurde, dass die so ermittelten Ergebnisse sich weniger als 10% voneinander unterscheiden, erfolgte die Kalibration ab dem 19.11.02 mit den Rohdaten (ΔmE).

Die Änderungen wurden jeweils durch parallele Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität und durch die Mitführung von Kontrollen validiert. Als pathologische Qualitätskontrolle diente das Plasma eines TTP-Patienten mit mildem ADAMTS-13-Mangel (43%). Die Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse dieses Kontrollplasmas für die Tests zwischen Januar 2002 und August 2003. Die Daten belegen einerseits die grundlegende Stabilität der ADAMTS-13 Bestimmung ($VK_{\text{gesamt}}=18,0\%$; $n=118$) und andererseits eine geringfügige Erniedrigung der Variabilität durch die beschriebenen Modifikationen. Der Variationskoeffizient von 30.01.02 bis 19.11.02 beträgt 18,2% ($n=63$), während der Variationskoeffizient vom 19.11.02-31.05.03 bei 16,7% ($n=55$) liegt. Die Substratcharge scheint keinen nennenswerten Einfluss auf die Qualität der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung zu haben.

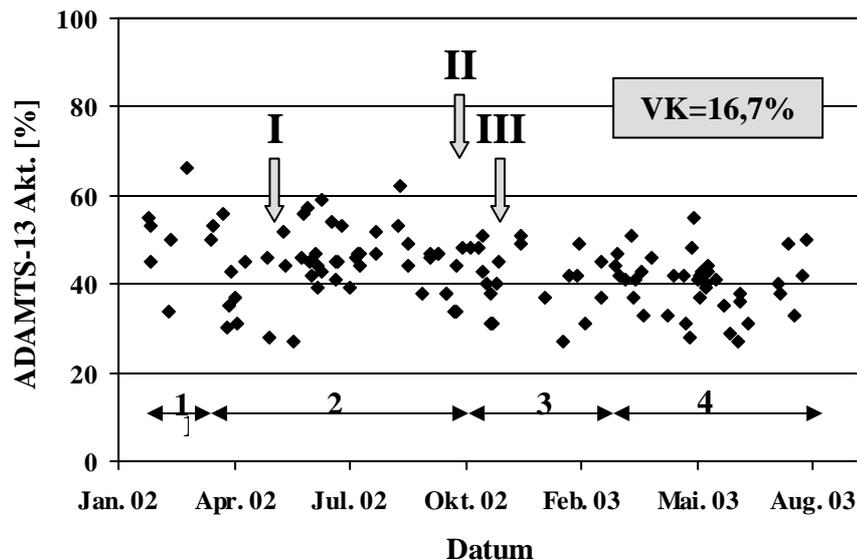


Abbildung 24: Inter-Assay-Variabilität der pathologischen Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurde bei jeder ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung zwischen Januar 2002 und August 2003 ($n=118$) die Plasmaprobe eines TTP Patienten mit mildem ADAMTS-13-Mangel getestet. Die senkrechten Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt für die Einführung der jeweiligen Modifikationen (siehe Text). Die waagerechten Pfeile illustrieren den Anwendungs-Zeitraum der entsprechenden Substratchargen (1=charge 87970100, gelöst am 23.07.01; 2=charge 87970101, gelöst am 25.03.02; 4=charge 87970101, gelöst am 29.07.02; 5=charge 87981050, gelöst am 23.04.03).

Nach Einführung der Modifikationen ergibt sich eine Inter-Assay-Variabilität von 16,7% für die abnormale Kontrolle mit einer ADAMTS-13-Aktivität von $43 \pm 7,7$ (MW \pm SD). Die normale Kontrolle mit einer ADAMTS-13-Aktivität von MW \pm SD = 108% \pm 9,3 ($n=14$) zeigt erwartungsgemäß eine deutliche niedrigere Inter-Assay-Variabilität von 8,6% (Abb. 25).

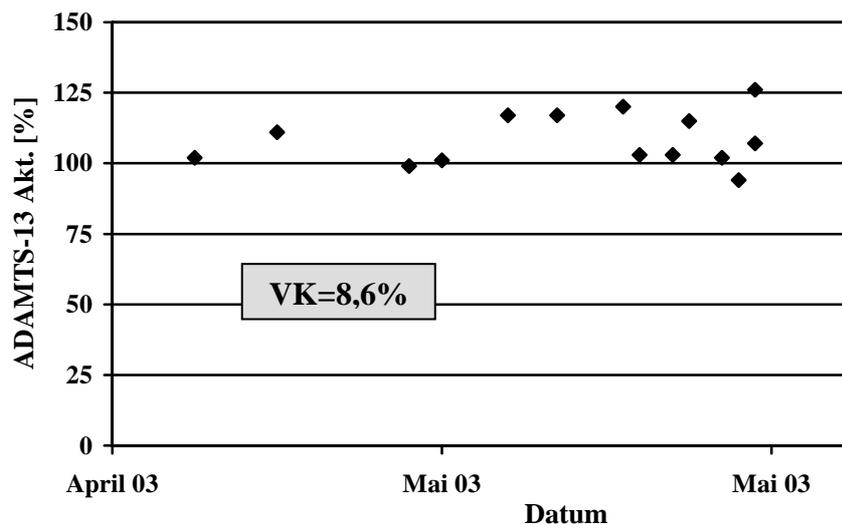


Abbildung 25: Inter-Assay-Variabilität der normalen Qualitätskontrolle

Für die Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität im Normalbereich wurde nach Einführung der Modifikationen in 10 unterschiedlichen Testreihen die ADAMTS-13-Aktivität im Plasma von einer gesunden Probandin bestimmt.

Die Intra-Assay-Variabilität für die normale und pathologische Qualitätskontrolle liegt mit 2,9% und 8,7% erwartungsgemäß weit unter der Inter-Assay-Variabilität (Abb. 26).

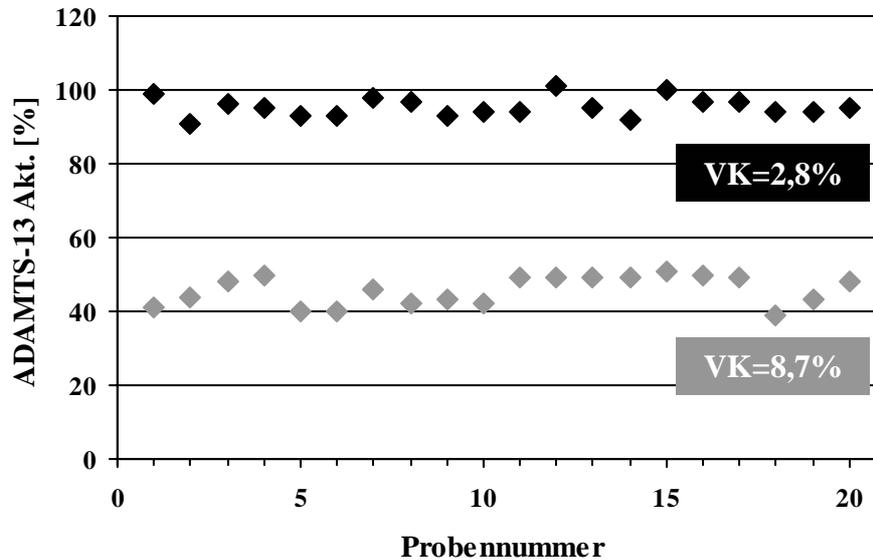


Abbildung 26: Intra-Assay-Variabilität für die normale und die pathologische Qualitätskontrolle

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurde die ADAMTS-13-Aktivität in einer Probe mit normaler und einer Probe mit pathologisch erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität 20 mal in der gleichen Versuchsreihe getestet.

Um den Einfluß der endogenen VWF:RCo in dem RCo-Verfahren zu testen, wurden bei verschiedenen Proben das Substrat durch Reaktionspuffer ersetzt. Diese Proben zeigten stets eine nicht messbare VWF:RCo. Zudem wurden 4 Proben mit ungewöhnlich hoher, interner VWF:RCo (>350%) von VWS-Patienten nach Gabe eines VWF-Konzentrates (Haemate-HS, Aventis Behring GmbH, Marburg, Deutschland) untersucht. Die getesteten Proben zeigten normale (definiert als nicht erniedrigt, siehe dazu Kapitel 4.1.) ADAMTS-13-Aktivität zwischen 61-167%.

Das, im entwickelten Verfahren verwendete, BC Von Willebrand Reagenz von Dade Behring GmbH (Marburg, Deutschland) dient üblicherweise zur Bestimmung der VWF-Aktivität in einer gegebenen Plasmaprobe (Kap. 1.2.3.). In dem hier entwickelten Verfahren wird das BC Von Willebrand Reagenz zur Bestimmung der Restaktivität eines exogenen VWF-Substrates in einem unphysiologischen Reaktionsmedium verwendet. Die VWF:RCo-Bestimmung im Plasma weist eine hohe Variabilität auf. Nach Herstellerangaben beträgt der Intra-Assay Variationskoeffizient der VWF:RCo-Bestimmung im Plasma für eine Probe mit normaler VWF:RCo 8,0 bis 9,6% und für eine Probe mit erniedrigter VWF:RCo 6,1% bis 16,2% [Dade Behring 2001]. Um die Variabilität der VWF:RCo-Messung in dem hier verwendeten Reaktionsmedium zu testen, wurden die Intra-Assay Variabilität für zwei Testproben mit unterschiedlicher VWF-Restaktivität ermittelt. Für die Probe mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität und resultierender hoher VWF-Restaktivität (MW=52%) ergibt sich ein Variationskoeffizient von 3,9% (n=8). Die Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität und

damit einhergehender niedriger VWF-Restaktivität (MW=30%) zeigt mit 7,5% (n=12) eine höhere Variabilität auf (Abb. 27).

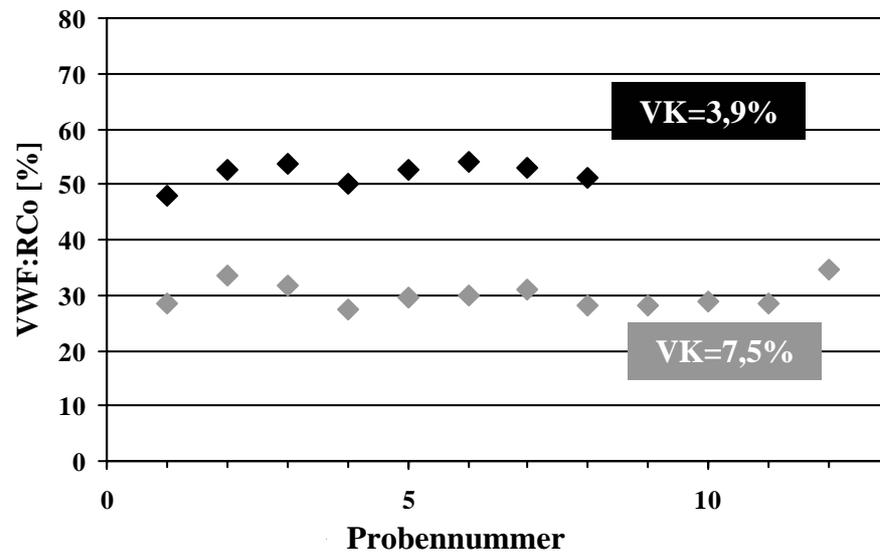


Abbildung 27: Variabilität der VWF:RCo Messung im Reaktionsmedium

Um die Variabilität der VWF:RCo-Bestimmung in dem gegebenen Reaktionsmedium zu testen, wurden bei zwei ausgewählten Testproben die VWF:RCo mehrfach (n=8 bzw. n=12) bestimmt.

Für die Erstellung des Normbereiches wurde die ADAMTS-13-Aktivität bei 80 gesunden Probanden (Normkollektiv I, Kap. 2.2.1.) bestimmt (Abb. 28). Die Frauen zeigten eine ADAMTS-13-Aktivität von 52 bis 114% (MW +/- SD = 89 +/-11), bei den Männern variierte die ADAMTS-13-Aktivität zwischen 58 und 134% (MW +/- SD = 88 +/-22). Die statistische Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Männern und Frauen ($p > 0,05$; Zweistichproben-t-Test). Aus diesem Grund ergibt sich für Männer und Frauen ein gemeinsamer Normbereich von 52-134%. Die ADAMTS-13-Aktivität bei den Männern variiert deutlich mehr als bei den Frauen ($SD_{\text{Männer}}=22$ vs. $SD_{\text{Frauen}}=11$).

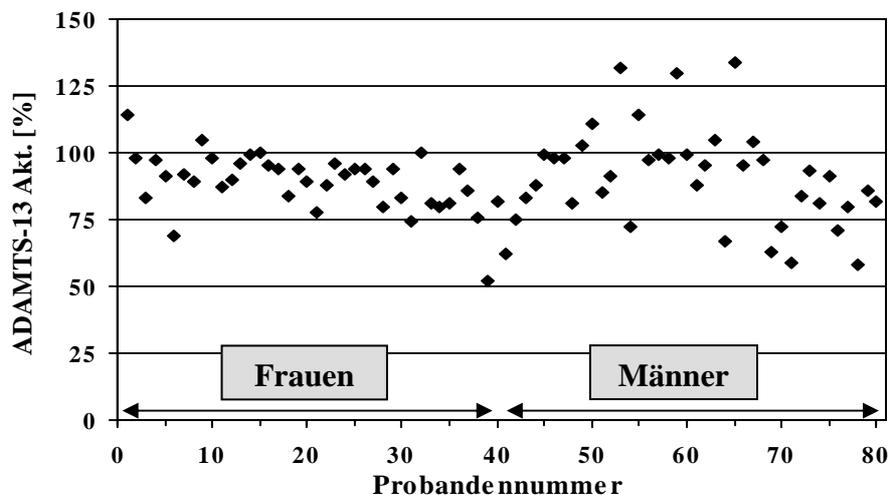


Abbildung 28: ADAMTS-13-Aktivität bei 80 gesunden Probanden

Die Abbildung zeigt die ADAMTS-13-Aktivität bei 40 gesunden Frauen und 40 gesunden Männern im Alter von 16 bis 58 Jahren.

3.1.3. Vergleich zwischen der Immunoblotting- und der RCo-Methode

Für die Validierung der entwickelten RCo-Methode wurden zwischen Juli 2001 und Januar 2002 insgesamt 282 Plasmaproben von Patienten und gesunden Personen parallel mit der RCo- und der Immunoblotting-Methode getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Bei 72 Proben mit schwerem Proteasemangel (<12,5 %) wurden mit beiden Methoden übereinstimmende Ergebnisse erhalten. Für einer Probe von einem TTP-Patienten unter Plasmapherese-Therapie wurde mit der Immunoblotting-Methode eine ADAMTS-13-Aktivität von 0-12,5% ermittelt, während sich bei Anwendung der RCo-Methode eine Aktivität von 18% ergab. Bei 19 Plasmaproben, die gemäß der Immunoblotting-Methode einen mittelschwerem Proteasemangel (12,5-25%) zeigten, wurden mit der RCo-Methode ADAMTS-13-Aktivitäten von 9-39% ermittelt. Für 64 Plasmaproben mit mildem ADAMTS-13-Mangel gemäß der Immunoblotting-Methode (25-50%) wurden mit der RCo-Methode ADAMTS-13-Aktivitäten zwischen 20 und 60% gemessen. 127 Proben zeigten übereinstimmend normale ADAMTS-13-Aktivitäten mit der Immunoblotting-Methode (>50%) und der RCo-Methode (52-152%).

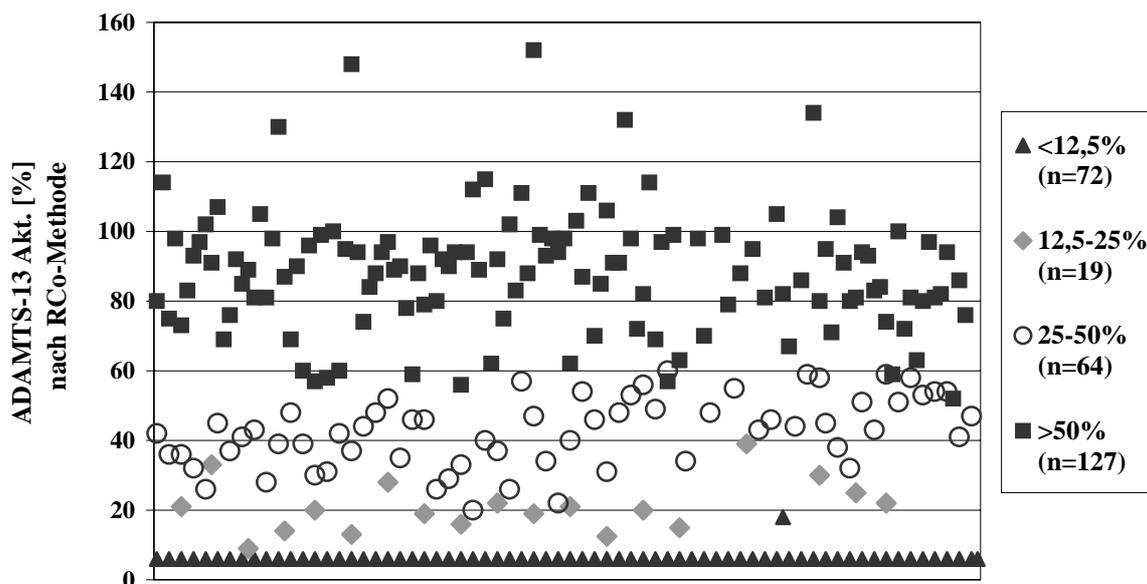


Abbildung 29: Vergleich zwischen der Immunoblotting- und der RCo-Methode

Die ADAMTS-13-Aktivität von 282 Plasmaproben wurden sowohl mit der Immunoblotting- als auch mit der RCo-Methode bestimmt. Die Plasmaproben wurden gemäß der Immunoblotting-Befunde wie folgt kategorisiert: schwerer Proteasemangel (<12,5%, Dreiecke), mittelschwerer Proteasemangel (12,5-25%, Rauten), milder Proteasemangel (25-50%, Kreise) und normale Proteaseaktivität (>50%, Vierecke). Die Ergebnisse der RCo-Methode für die entsprechenden Proben sind auf der y-Achse dargestellt.

Um den Vergleich zwischen den beiden Methoden mathematisch auszuwerten, wurden die Ergebnisse der RCo-Methode ebenfalls in die Kategorien eingeteilt, welche die Immunoblotting-Methode vorgibt. Es ergeben sich 77-100% Übereinstimmung in den verschiedenen Kategorien und eine Gesamt-Übereinstimmung von 94% (Tab. 6). 8 von 65 Proben mit mildem ADAMTS-13-Mangel gemäß der Immunoblotting-Methode zeigten grenzwertig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivitäten in dem RCo-Verfahren (50-55%). Genau

genommen ergibt sich für diese 8 Proben kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden, da diese Proben maximal 10% über der 50%-Schwelle liegen.

Tabelle 6: Prozentuale Übereinstimmung zwischen der Immunoblotting- und der RCo-Methode für die parallel getesteten Plasmaproben (n=282)

Die Ergebnisse der RCo-Methode wurden für diese Gegenüberstellung in die Kategorien eingeteilt, welche die Immunoblotting-Methode vorgibt. In der Tabelle ist die Probenanzahl für die jeweiligen Kategorien der Immunoblotting-Methode (Spalten) und RCo-Methode (Zeilen) angegeben.

<u>RCo:</u>	<u>Immunoblotting-Methode:</u>				Gesamt	Übereinstimmung
	<12,5%	12,5-25%	25-50%	<50%		
<12,5%	<u>72</u>	1	0	0	73	99%
12,5-25%	1	<u>13</u>	1	0	15	89%
25-50%	0	3	<u>49</u>	0	52	94%
>50%	0	0	14*	<u>127</u>	141	90%
Gesamt	73	17	64	127	282	
Übereinstimmung	99%	84%	77%	100%		<u>94%</u>

*Diese 14 Proben zeigen in dem RCo-Verfahren eine grenzwertige ADAMTS-13-Aktivität von 51-60%, 8 der 14 Proben haben eine Proteaseaktivität zwischen 51-55% und zeigen demnach $\leq 10\%$ Abweichung zur Immunoblotting-Methode (weitere Erklärungen siehe Text).

3.1.4. Internationale Multicenterstudie

Die Richtigkeit der entwickelten RCo-Methode wurde des weiteren durch Teilnahme an der ersten, internationalen Multicenterstudie zum Vergleich verschiedener Verfahren zur ADAMTS-13-Aktivität Bestimmung belegt. Dazu wurden 30 maskierte, tiefgefrorene Plasmaproben mit unterschiedlicher ADAMTS-13-Aktivität durch die Arbeitsgruppe von Prof. Lämmle (Bern, Schweiz) an 5 verschiedene europäische Labors geschickt. Im Labor von Prof. Lämmle wurden die Proben anhand der Immunoblotting-Methode (Kap. 1.5.1.) untersucht, die Arbeitsgruppen von Prof. Budde (Hamburg, Deutschland) und Dr. Varadi (Wien, Österreich) untersuchten die Proben mittels der Kollagenbindungsmethode (Kap. 1.5.3.), die Arbeitsgruppe von Prof. Girma bestimmte die ADAMTS-13-Aktivität mit dem zwei-seitigem ELISA (Kap. 1.5.4.) und wir analysierten die Proben mittels der entwickelten RCo-Methode. Für die Proben mit schwerem ADAMTS-13-Mangel erfolgte zusätzlich die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13. Die Messung der inhibitorischen Aktivität erfolgte hier mit der im Kapitel 2.6. beschriebenen Methode. Für die detaillierte Beschreibung der Methodik in den Laboratorien der anderen Teilnehmer sei auf die entsprechenden Publikationen verwiesen [Studt et al. 2003a; Furlan et al. 1997; Obert et al. 1999; Gerritsen et al. 1999; Veyradier et al. 2001]. Die Tabellen 7 und 8 illustrieren die Ergebnisse dieser Multicenter-Studie. Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der RCo-Methode und den Resultaten der anderen Teilnehmer belegen die Richtigkeit und Genauigkeit des entwickelten Verfahrens für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität als auch für die Detektion der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13.

Tabelle 7: Ergebnisse der Multicenterstudie [Studt et al. 2003a]

(A) Die Resultate für die ADAMTS-13-Aktivität aus den verschiedene Laboratorien

(B) Die Resultate der Inhibitortestung gegen ADAMTS-13 aus den verschiedenen Laboratorien

+ = Inhibitor deutlich positiv, (+) = fraglicher Inhibitor, 0 = Inhibitor negativ, n.d. = Inhibitortest nicht durchgeführt

(A)

Sample no.	ADAMTS-13 activity (%)					VWF:Ag (%)	Diagnosis / sample description
	Laboratory 1 Immunoblotting assay	Laboratory 2 Residual collagen binding activity	Laboratory 3 Residual collagen binding activity	Laboratory 4 Residual ristocetin cofactor activity	Laboratory 5 Immuno-radiometric assay		
1	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	122	TTP, probably acquired
2	< 5	< 3	< 3	< 6.25	< 5	188	Hereditary TTP
3	55	68	64	86	53	139	Acquired TTP in remission
4	100	80	95	85	96	186	Kasabach-Merritt syndrome
5	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	207	Acquired TTP
6	25	22	< 3	24	10	318	Acquired TTP (1 h after infusion of 4 units FFP)
7	35	29	26	30	34	619	Pediatric HUS
8	30	17	20	20	34	220	Suspected relapse of TTP, after splenectomy
9	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	146	Acquired TTP
10	45	45	27	50	61	138	1:1 mixture of NHP and congenitally ADAMTS-13 deficient plasma
11	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	162	Acquired TTP
12	8	6	5	13	7	62	TTP, probably hereditary (24 h after infusion of 3 units FFP)
13	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	202	Acquired TTP
14	50	48	36	58	86	376	HUS
15	5	7	< 3	< 6.25	5	69	TTP, probably hereditary (48 h after infusion of 3 units FFP)
16	35	28	38	53	34	160	HUS
17	20	15	4	34	19	155	1:3 mixture of NHP and congenitally ADAMTS-13 deficient plasma
18	100	58	84	114	110	192	Suspected antiphospholipid antibody-syndrome
19	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	356	Hereditary TTP
20	30	49	16	46	16	286	Pediatric HUS
21	58	61	35	60	68	280	Suspected TMA
22	8	< 3	< 3	10	< 5	165	TTP, probably acquired
23	< 5	< 3	< 3	< 6.25	< 5	305	Acquired TTP
24	50	48	47	62	62	268	Atypical pediatric HUS
25	8	< 3	< 3	12	< 5	168	Suspected atypical HUS vs. TTP?
26	100	88	112	100	85	89	Acquired TTP in remission
27	< 3	< 3	< 3	< 6.25	< 5	173	TTP, probably acquired
28	50	64	24	59	32	387	TMA with disseminated neoplasia
29	100	65	107	91	99	428	Pediatric HUS
30	< 3	44	< 3	< 6.25	< 5	252	Hereditary TTP

(B)

Sample no.	Laboratory 1 Immunoblotting assay	Laboratory 2 Residual collagen binding activity	Laboratory 3 Residual collagen binding activity	Laboratory 4 Residual ristocetin cofactor activity	Laboratory 5 Immuno-radiometric assay
1	(+)	0	0	(+)	0
2	0	0	0	0	0
5	+	+	+	+	+
6	+	(+)	0	n.d.	0
9	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	0	0	0	0	+
13	+	+	+	+	+
15	(+)	0	0	0	0
19	0	0	(+)	0	0
22	0	0	0	0	+
23	(+)	+	0	0	0
25	0	+	0	0	0
27	(+)	+	0	0	+
30	0	0	0	0	0

Tabelle 8: Statistische Analyse für die Ergebnisse der Multicenterstudie

Die einzelnen Methoden wurden mittels der Spearman-Rang Korrelation miteinander verglichen, die Tabelle zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten ($p < 0,01$).

	Laboratory 1 Immunoblotting assay	Laboratory 2 Residual collagen binding activity 1	Laboratory 3 Residual collagen binding activity 2	Laboratory 4 Residual ristocetin cofactor activity	Laboratory 5 Immuno-radiometric assay
Laboratory 1 Immunoblotting assay	1.00	0.89	0.93	0.97	0.95
Laboratory 2 Residual collagen binding activity 1		1.00	0.89	0.90	0.89
Laboratory 3 Residual collagen binding activity 2			1.00	0.95	0.95
Laboratory 4 Residual ristocetin cofactor activity				1.00	0.94
Laboratory 5 Immuno-radiometric assay					1.00

3.2. ADAMTS-13 und TTP

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die ADAMTS-13-Aktivität in 815 Plasmaproben von 29 Patienten mit TTP untersucht. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Ergebnisse der ADAMTS-13-Aktivität und des neutralisierenden Inhibitors gegen ADAMTS-13 (der im folgenden lediglich als Inhibitor bezeichnet wird) für alle untersuchten Patienten in akuter Phase und in Remission dargestellt (Kap. 3.2.1. - Kap. 3.2.2.). Das Kapitel 3.2.3. behandelt die Wirkung der Plasmapherese-Therapie auf die ADAMTS-13-Aktivität und auf den Inhibitortiter und die mögliche Korrelation zur Thrombozytenanzahl bzw. zur klinischen Symptomatik. Im Kapitel 3.2.4. wird der Langzeitverlauf des Inhibitortiters in Remission für Patienten mit anhaltendem, schwerem ADAMTS-13-Mangel während der PP-Therapie gezeigt.

3.2.1. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit TTP

Alle 29 untersuchten Patienten mit TTP (Männer/Frauen = 8/21) präsentierten anamnestisch eine erworbene TTP (Kap. 2.3.1.). Bei 18 Patienten konnten die ADAMTS-13-Aktivität in der akuten Phase und in Remission bestimmt werden, während 2 Patienten nur in der akuten Phase und 9 weitere Patienten nur in Remission untersucht werden konnten (Tab. 2). Die ADAMTS-13-Aktivität in der akuten Phase (Erstmanifestation und/oder Rezidiv) bezeichnet immer die Aktivität vor Beginn der PP-Therapie. Da die Einleitung der Plasmapherese oft direkt nach Einweisung und klinischer Diagnose erfolgen muss (Kap. 4.1.), konnte bei einigen Patienten keine Blutprobe vor Therapiebeginn gewonnen werden. Die Abbildung 30 zeigt zusammenfassend die ADAMTS-13-Aktivität in akuter Phase und in Remission bei den untersuchten Patienten.

18 von 20 Patienten (90%) mit akuter TTP präsentierten einen hochgradigen ADAMTS-13-Mangel bei nicht detektierbarer Aktivität (<6,25%). Eine Patientin zeigte eine deutlich messbare ADAMTS-13-Aktivität von 49%. 6/20 Patienten konnten in mehrmaligen TTP-Episoden untersucht werden (n=2-3). 5 von diesen 6 Patienten zeigten in den stattgefundenen Rezidiven stets einen schweren ADAMTS-13-Mangel. Ein Patient zeigte bemerkenswerterweise in seinem ersten Rezidiv eine ADAMTS-13-Aktivität <6,25% und in den beiden darauffolgenden Rezidiven eine deutlich messbare ADAMTS-13-Aktivität von 23% (dargestellt durch graue Raute in Abbildung 30). Insgesamt wurden 28 Proben aus der akuten Phase untersucht, wobei 25/28 Proben (89%) eine hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität zeigten. Die 18 Patienten, welche in akuter Phase und in Remission untersucht wurden, zeigten in Remission eine normale (n=8), moderat erniedrigte (n=7) oder hochgradig erniedrigte (n=3) ADAMTS-13-Aktivität. Die Patientin mit einer ADAMTS-13-Aktivität von 49% in der akuten Phase demonstriert in Remission ebenfalls einen milden ADAMTS-13-Mangel von 39%. Bei den 9 Patienten, die nur in Remission untersucht werden konnten, zeigte sich bei 2 Patienten ein hochgradiger ADAMTS-13-Mangel, während 4 Patienten eine moderat erniedrigte und 3 Patienten eine normale ADAMTS-13-Aktivität aufwiesen. Bei der ADAMTS-13-Aktivität in Remission wird stets der durchschnittliche Wert aus allen

untersuchten Blutproben in Remission (n=2-27) angegeben. In Remission wurde bei 5 Patienten ohne Anzeichen einer akuten TTP ein vorübergehender Abfall der ADAMTS-13-Aktivität auf <6,25% beobachtet. Bei diesen Patienten wurden die entsprechenden Plasmaproben für die Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt.

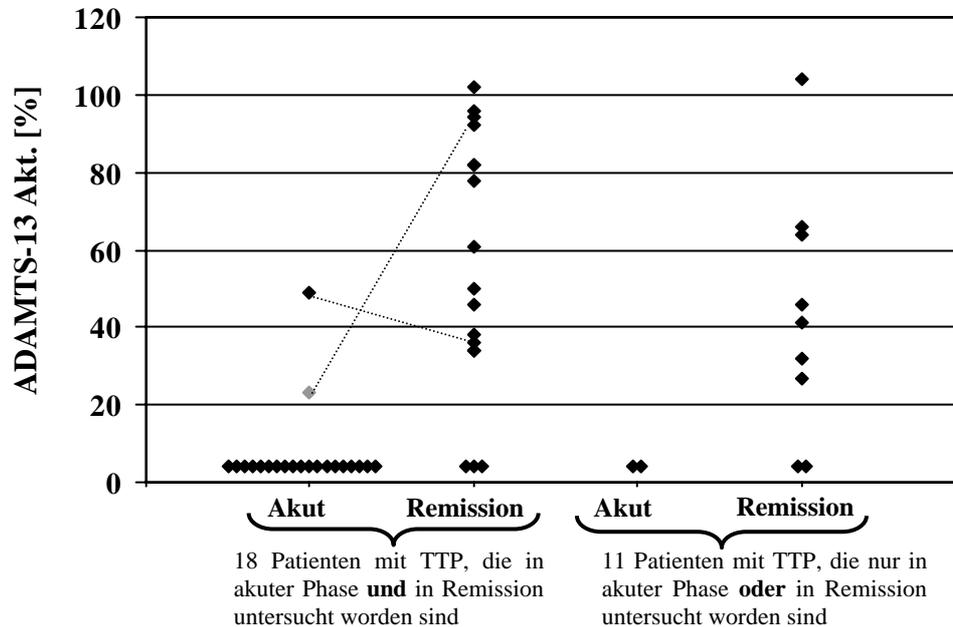


Abbildung 30: ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit TTP

Akut: ADAMTS-13-Aktivität vor Therapie, 6/19 Patienten wurden bei mehrmaligen TTP-Episoden untersucht. 5 von diesen 6 Patienten zeigten stets einen schweren ADAMTS-13-Mangel (<6,25%), welcher in dieser Abbildung nur einmalig dargestellt ist. Die graue Raute (ADAMTS-13-Aktivität=23%) illustriert dagegen die ADAMTS-13-Aktivität eines Patienten im 2. und 3. Rezidiv, welcher im 1. Rezidiv eine Aktivität von <6,25% zeigte.

Remission: Durchschnittliche ADAMTS-13-Aktivität in Remission

Für die beiden Patienten mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität bei akuter TTP sind die Ergebnisse der akuten Phase und der Remission durch eine gestrichelte Linie miteinander verbunden.

3.2.2. Inhibitoren gegen ADAMTS-13 bei Patienten mit TTP

Proben mit einem hochgradigen ADAMTS-13-Mangel wurden auf inhibitorische Aktivität gegen ADAMTS-13 getestet. Die Abbildung 31 zeigt die Resultate der Inhibitorbestimmung in 48 Plasmaproben von 24 Patienten.

17/20 Plasmaproben aus der akuten Phase zeigten einen messbaren Inhibitortiter (Nachweisgrenze: 0,4 U/ml) zwischen 0,4 und 62 U/ml. Bei 3/24 Patienten konnte trotz hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität kein Inhibitor detektiert werden. 4 der 5 getesteten Patienten mit persistierendem, schweren ADAMTS-13-Mangel in Remission zeigten einen messbaren Inhibitor zwischen 0,7 und 64,5 U/ml. Für den Inhibitortiter ergibt sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen Erstmanifestation, Rezidiv und Remission ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Für 2 Patienten konnte der Inhibitortiter bei Erstmanifestation und im Rezidiv bestimmt werden, für 3 weitere Patienten

wurde der Inhibitortiter im Rezidiv und in Remission untersucht (jeweils angezeigt durch gestrichelte Linie in Abb. 31). Auch bei diesen Patienten ergibt sich kein erkennbarer Zusammenhang zwischen Inhibitortiter und Krankheitsstadium.

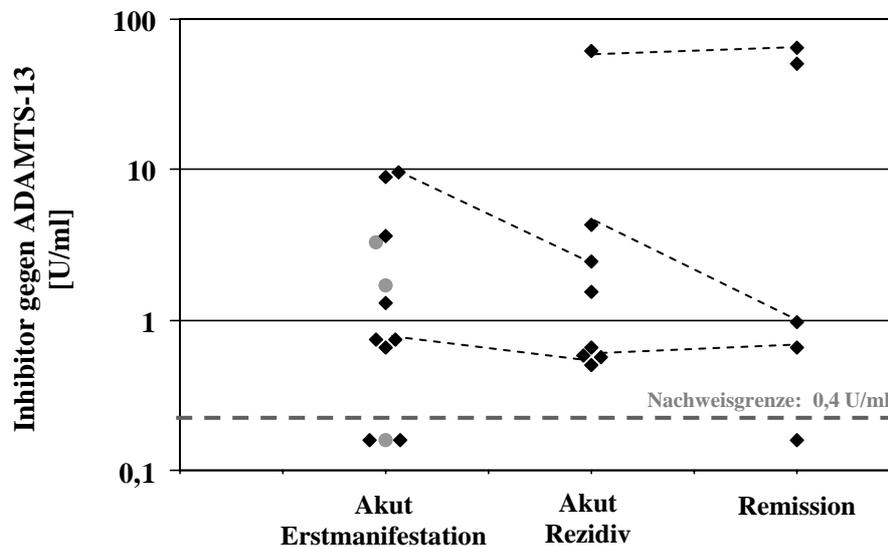


Abbildung 31: Inhibitortiter bei Patienten mit TTP

Akut: Inhibitortiter vor Beginn der Plasmapheresetherapie. Für drei Patienten konnte der Inhibitortiter nur im Frührezidiv während der Erstmanifestation ermittelt werden (graue Kreise). Ein Frührezidiv ist definiert als erneuter, starker Abfall der Thrombozytenanzahl unter täglicher oder zwei-täglicher PP-Behandlung.

Remission: Mittelwert des Inhibitortiters für alle untersuchten Blutproben in Remission (n=2-9). Für die Berechnung des Mittelwertes wurde nur der Inhibitortiter in langanhaltender Remission berücksichtigt (Zeitraum nach letzter PP Behandlung: > 5 Monate), da bei einigen Patienten ein vorübergehender Inhibitoranstieg im Verlauf der PP-Behandlung beobachtet wurde (Kap. 3.2.3.).

2 Patienten wurden bei Erstmanifestation und im Rezidiv und 3 Patienten wurde im Rezidiv und in Remission untersucht, die zum selben Patienten gehörenden Werte sind jeweils durch eine gestrichelte Linie miteinander verbunden.

3.2.3. Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter während der Plasmapherese-Therapie

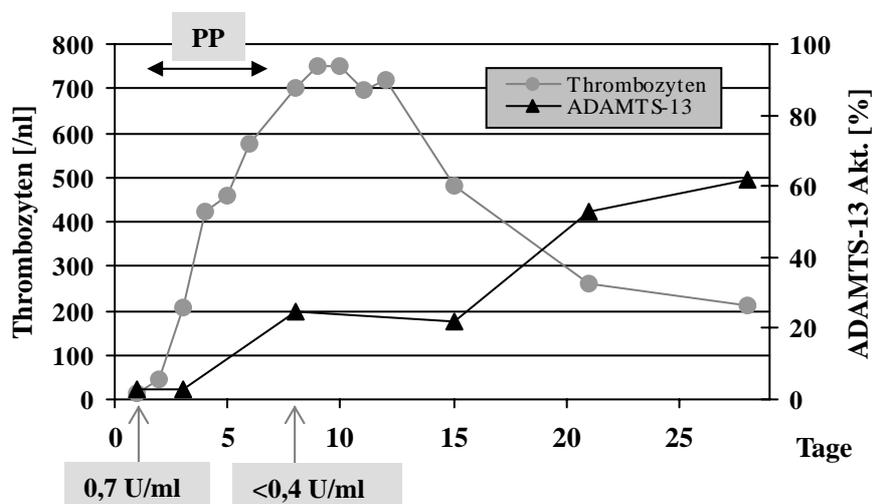
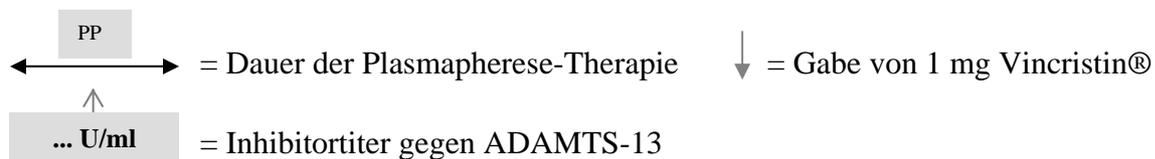
Um den Effekt der Plasmapherese-Therapie auf die ADAMTS-13-Aktivität und den Inhibitortiter zu untersuchen, erfolgte bei 20 TTP-Episoden von 18 Patienten die serielle Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität und des Inhibitortiters im Verlauf der akuten Episode (10 Erstmanifestationen und 10 Rezidive).

Die TTP-Diagnose erfolgte durch die behandelnden Kliniker nach den im Kapitel 2.3.1 beschriebenen Kriterien. Die Diagnose eines TTP-Rezidives erfolgte bei den meisten Patienten ausschließlich durch die laborchemischen Befunde bei Routine-Kontrolluntersuchungen. Aufgrund der frühzeitigen Diagnose mit den entsprechenden therapeutischen Maßnahmen blieben Patienten im TTP-Rezidiv ohne klinische Anzeichen einer akuten TTP oder erlitten nur leichte Symptome (Hämatome, Cephalgien, amnestische Aphasie).

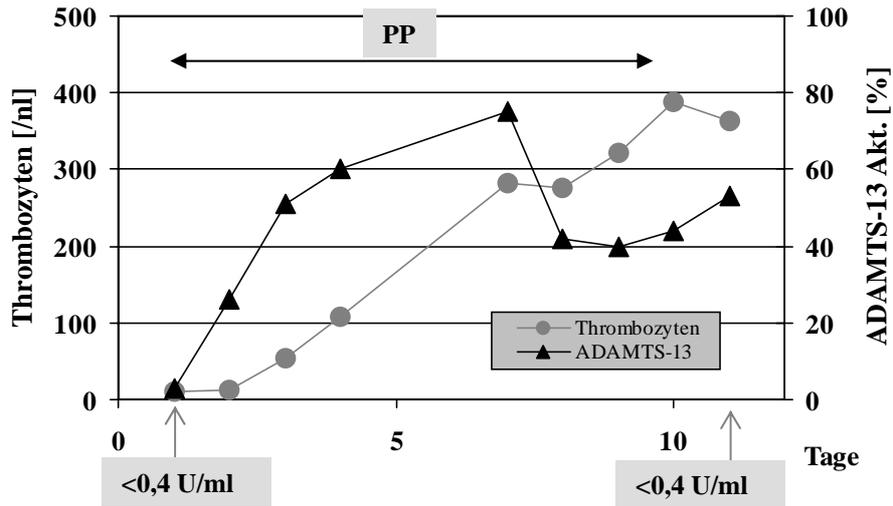
In 18/20 untersuchten Episoden bei 16/18 Patienten zeigte sich eine schwerer ADAMTS-13-Mangel vor Therapiebeginn. Alle Patienten wurden mit täglicher oder zweitäglicher Plasmapherese gegen FFP (3 l/Tag) bis zur Normalisierung der Thrombozytenanzahl und des LDH-Spiegels für mindestens 3 Tage behandelt. Eine Patientin (Abb. 32 I) wurde auf eigenen Wunsch vor der stabilen Normalisierung der Thrombozytenanzahl und des LDH-Spiegels in ein ausländisches Krankenhaus (USA) verlegt. Patienten mit schweren neurologischen Symptomen (generalisierte Grand-mal negative Krampfanfälle oder/und Koma) oder unbefriedigendem Anstieg der Thrombozyten erhielten zusätzlich Vincristin® (1 mg/Tag für 3-4 nacheinanderfolgende Tage). Eine Patientin wurde aufgrund eines steigenden Inhibitortiters unter PP-Therapie mit Rituximab (2 mal 375 mg/m²) behandelt. Alle Patienten erhielten außerdem im gesamten Verlauf Corticosteroide (1-1,5 mg/kg Körpergewicht/Tag). Die Blutentnahme erfolgte immer morgens vor der PP-Behandlung.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Thrombozytenanzahl für die untersuchten Patienten mit Erstmanifestation der TTP (Abb. 32) und einem Rezidiv der TTP (Abb. 33). Die ADAMTS-13-Aktivität wird dabei mit der Thrombozytenanzahl verglichen, da die letzteren den klinischen Verlauf sehr deutlich widerspiegeln. In den Überschriften der jeweiligen Diagramme sind die wichtigsten Daten der Patienten und deren klinische Symptomatik zusammengefasst. Die Diagramme zeigen zudem Dauer und Anzahl der PP-Behandlungen, die Gabe von Vincristin® bzw. Rituximab und den Inhibitortiter.

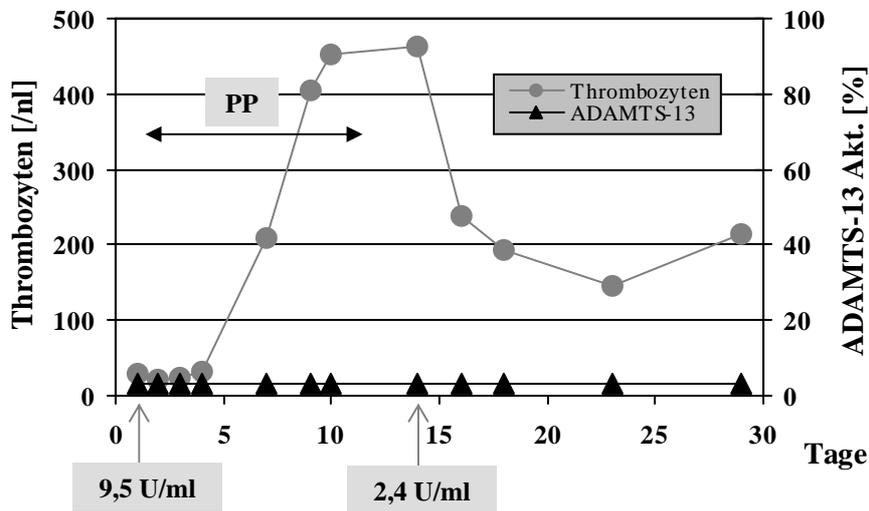
Abbildung 32: Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität, Thrombozytenanzahl und Inhibitortiter bei 10 Patienten mit einer TTP-Erstmanifestation



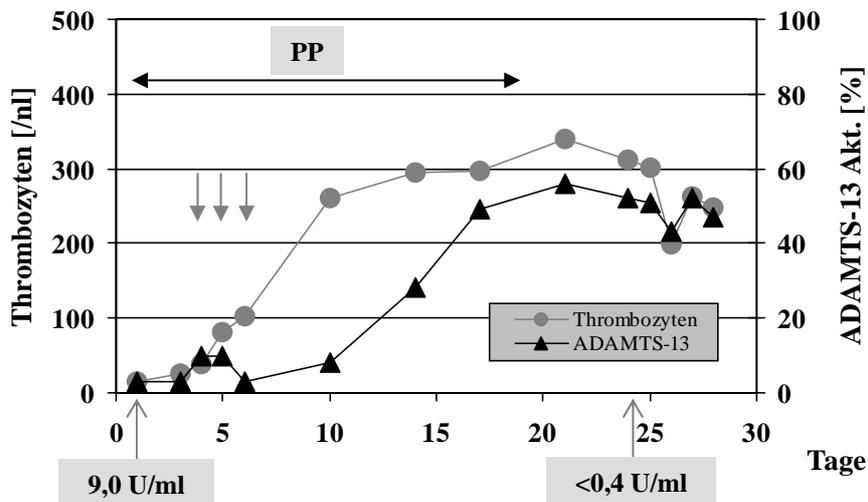
(A) Patient R.K.: 36 Jahre, männlich, 6 PP-Behandlungen, Patient zeigte diverse neurologische Symptome ohne Krampfanfälle



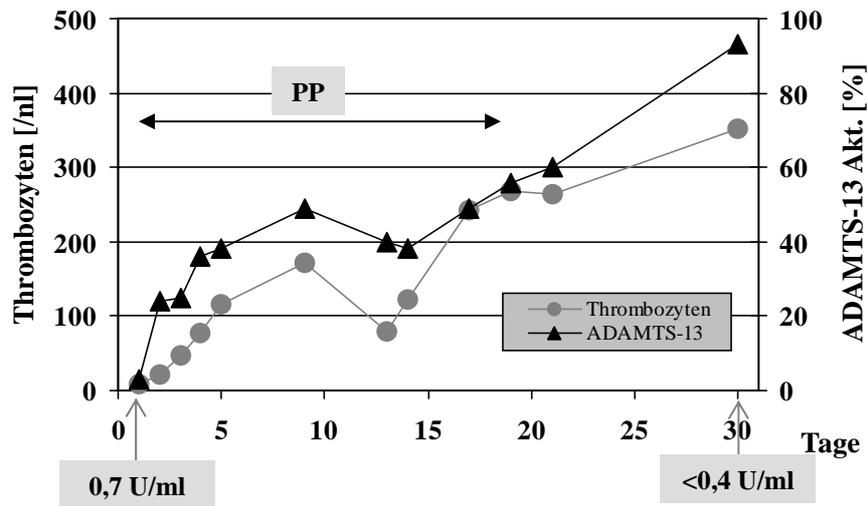
(B) Patientin Z.S.: 35 Jahre, weiblich, 7 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome ohne Krampfanfälle



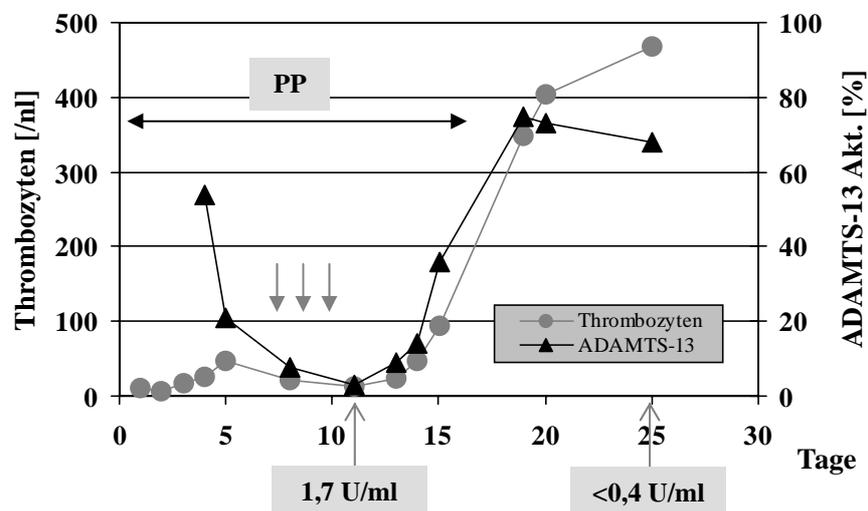
(C) Patientin M.A.: 27 Jahre, weiblich, 8 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome ohne Krampfanfälle



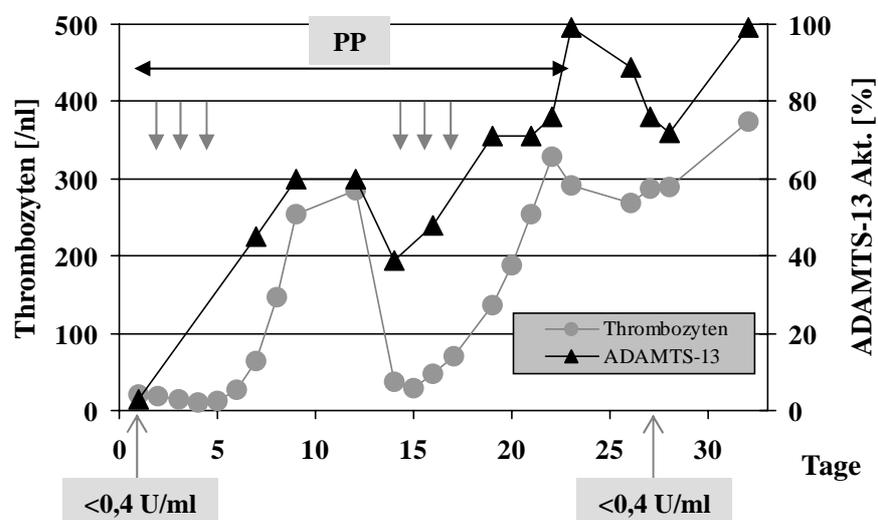
(D) Patientin H.R.: 47 Jahre, weiblich, 13 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome und einen Krampfanfall am Tag 1 und Koma am Tag 4



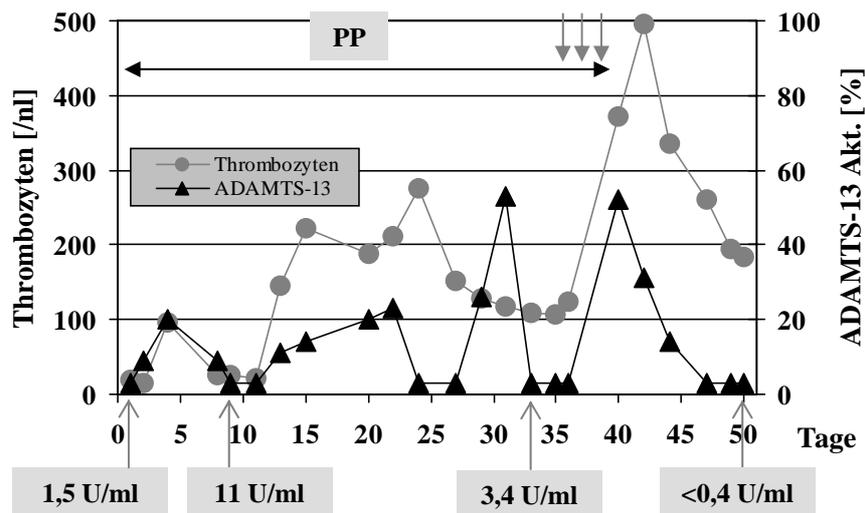
(E) Patientin Mo.M.: 39 Jahre, weiblich, 15 PP-Behandlungen, Patientin zeigte außer Cephalgien keine neurologischen Symptome



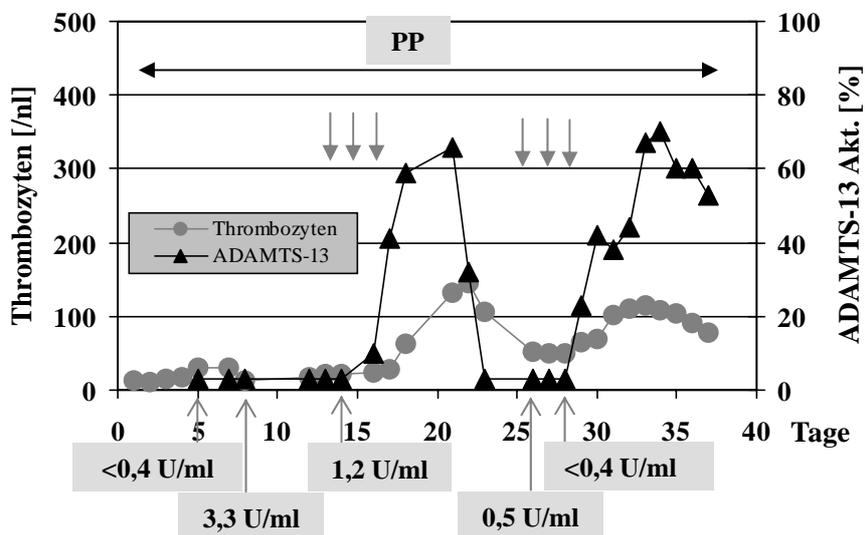
(F) Patientin Ar.M.: 52 Jahre, weiblich, 17 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome mit Krampfanfällen an den Tagen 1-3



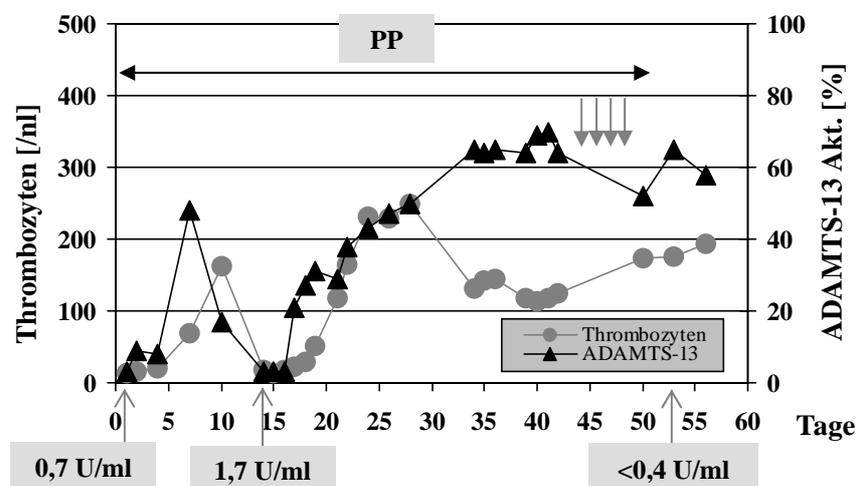
(G) Patient G.D.: 41 Jahre, männlich, 20 PP-Behandlungen, Patient zeigte diverse neurologische Symptome mit einem Krampfanfall am Tag 2



(H) Patientin C.P.: 21 Jahre, weiblich, 31 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome ohne Krampfanfälle



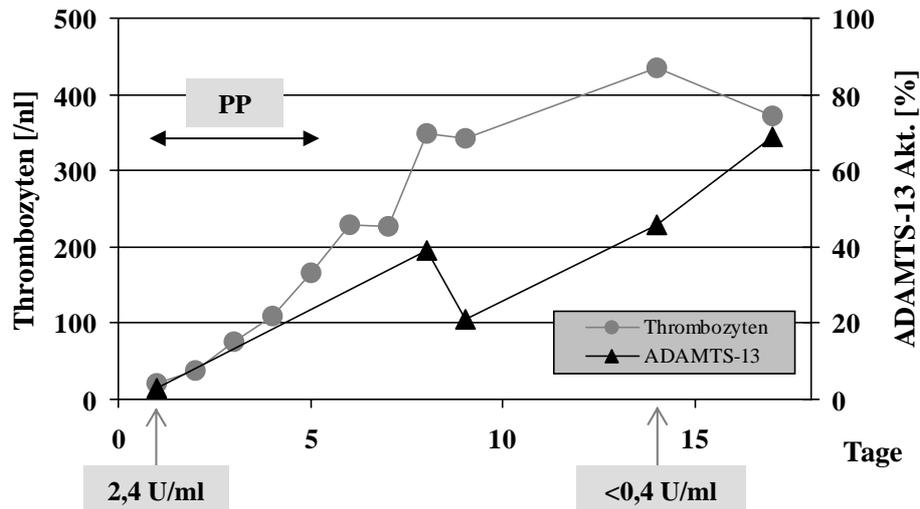
(I) Patientin C.E.: 28 Jahre, weiblich, 36 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome und Krampfanfälle an den Tagen 22 und 25



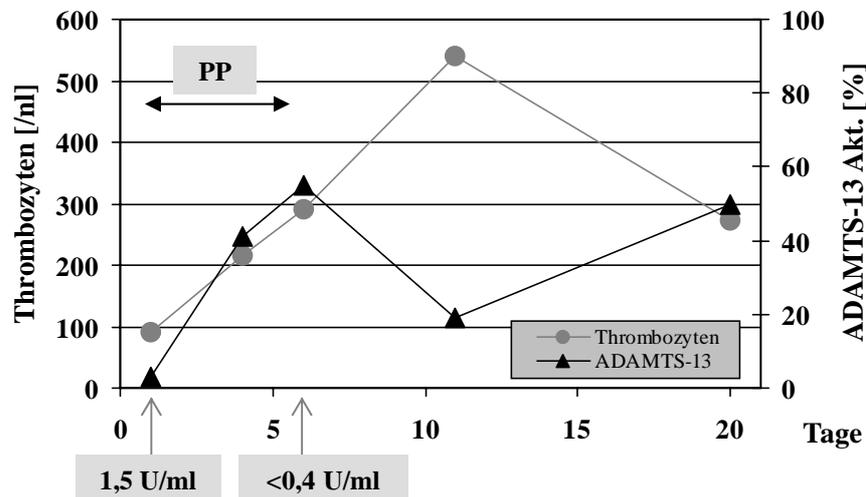
(J) Patientin H.M.: 67 Jahre, weiblich, 37 PP-Behandlungen, Patientin zeigte diverse neurologische Symptome und Krampfanfälle an den Tagen 1, 3, 4, 16 und 17

Abbildung 33: Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität, Thrombozytenanzahl und Inhibitor-titer bei 10 Patienten mit einem TTP-Rezidiv

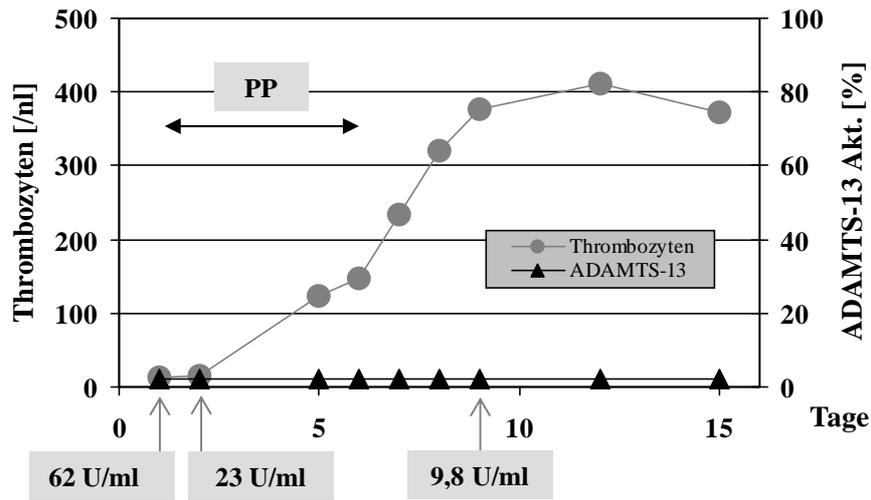
← → = Dauer der Plasmapherese-Therapie ↓ = Gabe von Rituximab (375 mg/m²)
 ↑ = Inhibitor-titer gegen ADAMTS-13 ED = TTP-Erstmanifestation



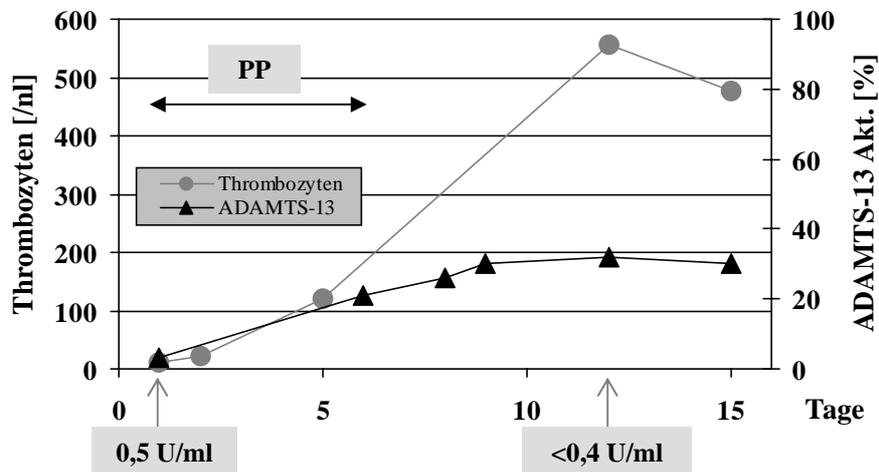
(A) Patientin M.A.: 28 Jahre, 1. Rezidiv 19 Monate nach ED (siehe Abb. 33 C), 5 PP-Behandlungen, Patientin zeigte keine klinischen Symptome



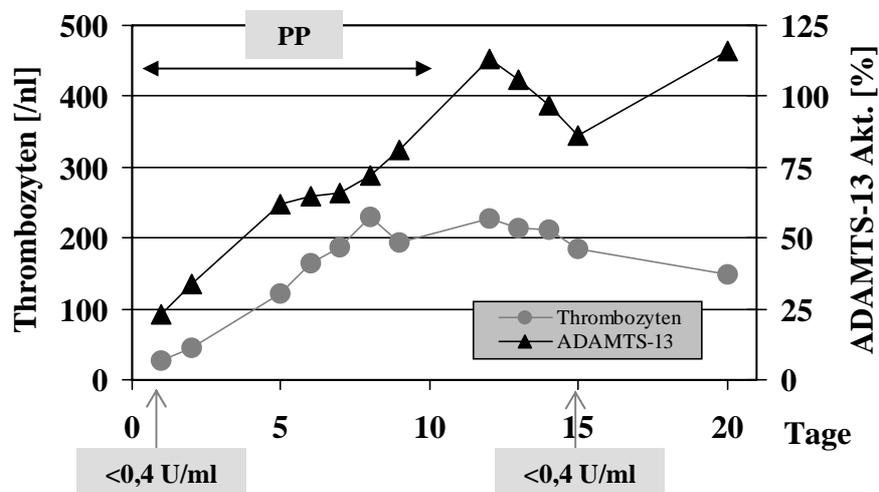
(B) Patientin H.B.: 58 Jahre, weiblich, 3. Rezidiv 63 Monate nach ED, 5 PP-Behandlungen, Patientin zeigte leichte neurologische Symptome (amnestische Aphasie)



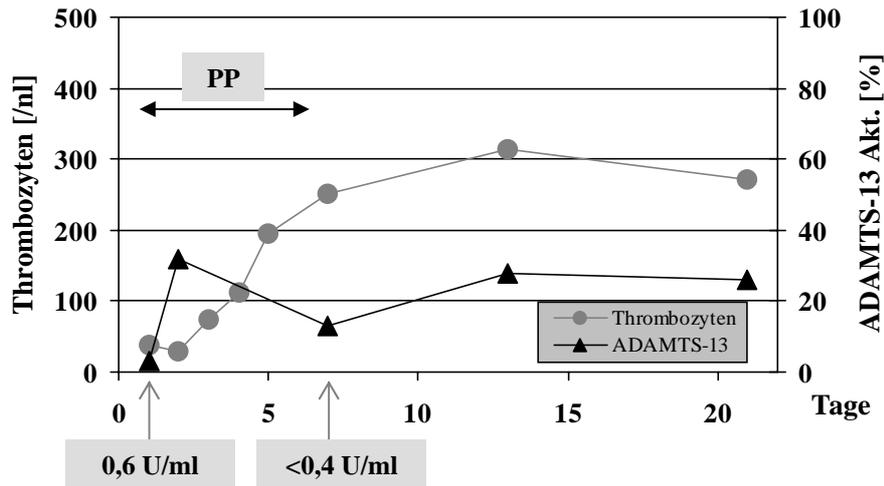
(C) Patientin Ah.M.: 39 Jahre, weiblich, 6. Rezidiv 20 Jahre nach ED, 5 PP-Behandlungen, Patientin zeigte außer Hämatomen keine klinischen Symptome



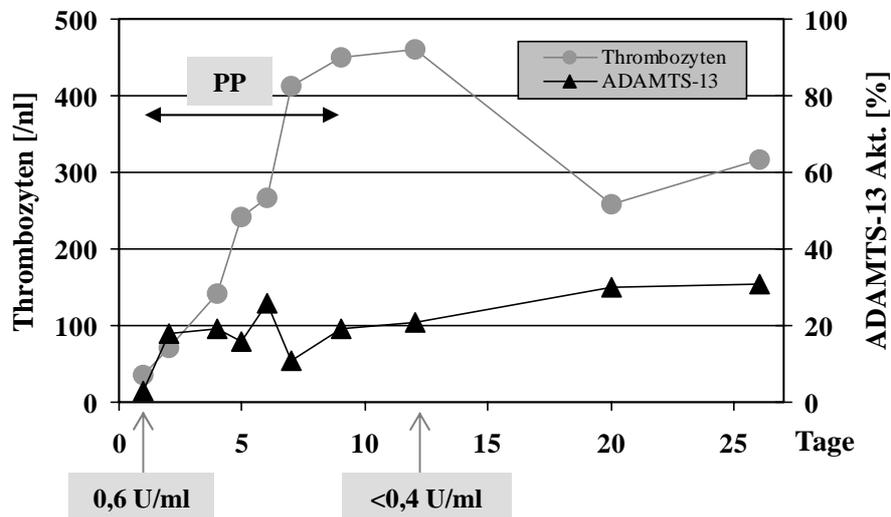
(D) Patient R.K.: 37 Jahre, männlich, 1. Rezidiv 20 Monate nach ED (siehe Abb. 32 A), 6 PP-Behandlungen, Patient zeigte keine klinischen Symptome



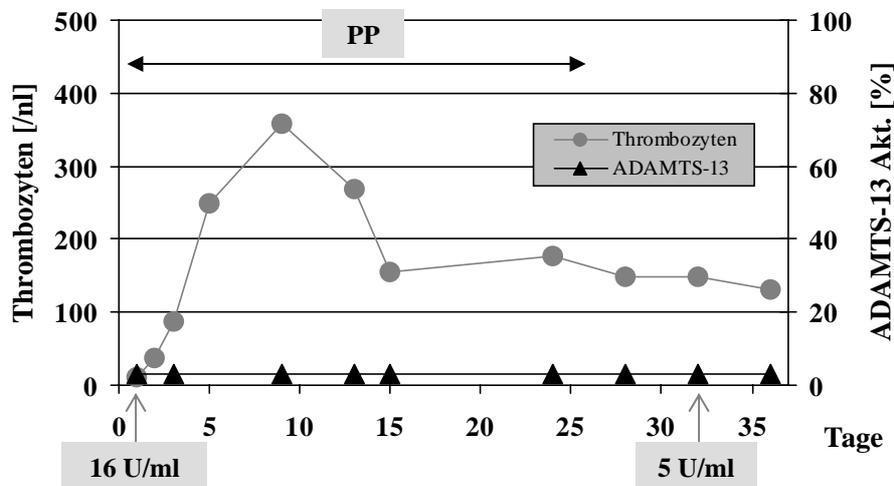
(E) Patient S.F.: 58 Jahre, männlich, 2. Rezidiv 4 Monate nach ED, 6 PP-Behandlungen, außer Cephalgien keine klinischen Symptome



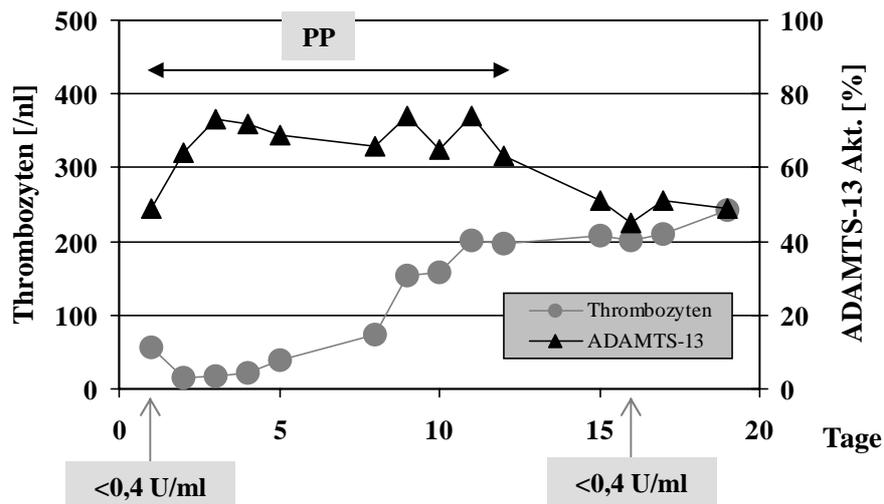
(F) Patient E.L.: 47 Jahre, männlich, 2. Rezidiv 12 Monate nach ED, 7 PP-Behandlungen, Patient zeigte außer Hämatomen keine klinischen Symptome



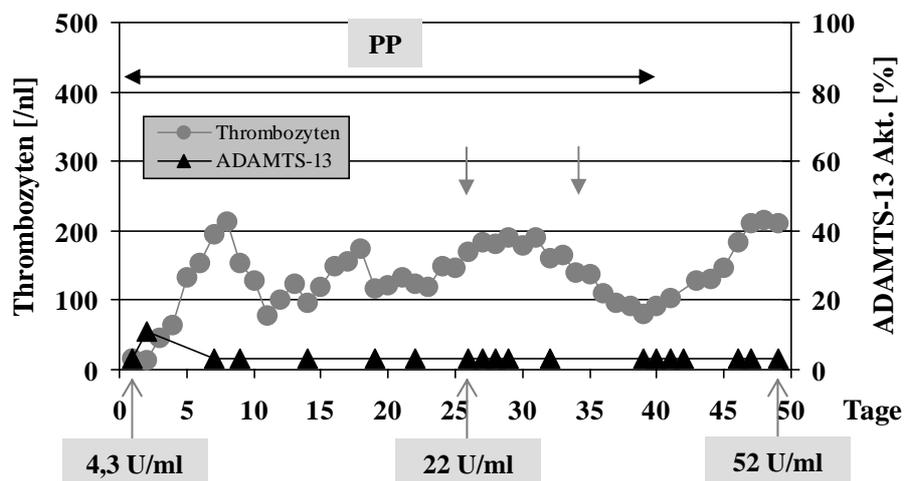
(G) Patient G.S.: 36 Jahre, männlich, 1. Rezidiv 8 Monate nach ED, 8 PP-Behandlungen, Patient zeigte keine klinischen Symptome



(F) Patient H.P.: 54 Jahre, männlich, 9. Rezidiv 52 Monate nach ED, 9 PP-Behandlungen, Patient zeigte keine klinischen Symptome



(H) Patientin M.S.: 30 Jahre, weiblich, 3.Rezidiv 208 Monate nach ED, 12 PP-Behandlungen, Patientin zeigte außer Cephalgien keine klinischen Symptome



(I) Patientin T.H.: 67 Jahre, weiblich, 8.Rezidiv 186 Monate nach ED, 25 PP-Behandlungen, Patientin zeigte keine klinischen Symptome

Die in Abbildung 32 und 33 dargestellten Verläufe und die Daten einer weiteren Patientin (B.M.) sind zusammenfassend in Tabelle 9 dargestellt. Der Buchstabe in der ersten Tabellen-Spalte bezeichnet dabei die zugehörige Graphik in den Abbildungen 32 und 33.

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, Inhibitortiter, Thrombozytenanzahl und CRP-Spiegel und die therapeutische Wirksamkeit der PP-Therapie

(w) = weiblich; (m) = männlich

Klinik: 1 = Cephalgien, Hämatome, Petechien, Makrohämaturie oder keine klinischen Symptome

2 = diverse neurologische Symptome (Aphasie, Paresen, Bewusstseinstörungen und weitere zentral-motorische bzw. sensorische-neurologische Störungen)

3 = Grand-mal negative Krampfanfälle oder/und Koma

Response: Rapide = anhaltende Normalisierung der Thrombozyten nach ≤ 5 PP-Behandlungen

Verzögert = Normalisierung der Thrombozyten nach ≥ 9 PP-Behandlungen oder schwacher Abfall der Thrombozyten auf >75 /nl unter PP-Therapie

Part. Rem.: Partielle Remission ohne vollständige und anhaltende Normalisierung der Thrombozyten

Frührezidiv = Starker Abfall der Thrombozyten auf <40 /nl unter PP-Therapie

PP: Anzahl der notwendigen PP-Behandlungen bis zur Normalisierung der Thrombozytenanzahl und des LDH-Spiegels für mindestens 3 Tage

Thr: Thrombozytenanzahl bei TTP-Diagnose vor Beginn der PP-Therapie (Normwerte: 150-400 /nl)

CRP: C-reaktives Protein vor Beginn der PP-Therapie (Normwerte: $<0,5$ mg/dl)

A-13 Akt. vor PP: ADAMTS-13-Aktivität vor Beginn der PP-Therapie (Normwerte: 52-138%)

Inhibitor vor PP: Inhibitor vor Beginn der PP-Therapie

A-13 Akt. nach PP: ADAMTS-13-Aktivität 2-8 Tage nach Abschluss der PP-Therapie (Normwerte: 52-138%)

Inhibitor nach PP: Inhibitor 2-8 Tage nach Abschluss der PP-Therapie

Inhibitor während PP: $\uparrow\downarrow$ = transienter Anstieg des Inhibitortiters während der PP-Therapie

\downarrow = Abfall des Inhibitortiters während der PP-Therapie

\uparrow = kontinuierlicher Anstieg des Inhibitortiters während der PP-Therapie

Patient	Alter [Jahre] w/m	Klinik	Response	PP	Thr [nl]	CRP [mg/dl]	A-13 Akt. vor PP [%]	Inhibitor vor PP [U/ml]	A-13 Akt. nach PP [%]	Inhibitor nach PP [U/ml]	Inhibitor während PP
(A) R.K.	36 (m)	2	Rapide	6	15	5,1	$<6,25$	0,7	22	$<0,4$	\downarrow
(B) Z.S.	35 (w)	2	Rapide	7	10	0,8	$<6,25$	$<0,4$	67	$<0,4$	
(C) M.A.	27 (w)	2	Rapide	8	29	0,7	$<6,25$	9,5	$<6,25$	2,4	\downarrow
(D) H.R.	47 (w)	3	Verzögert	13	15	1,1	$<6,25$	9	52	$<0,4$	\downarrow
(E) Mo.M	39 (w)	1	Verzögert	15	8	14,4	$<6,25$	0,7	93	$<0,4$	\downarrow
(F) Ar.M.	52 (w)	3	Frührezidiv	17	10	3,4	$<6,25^*$	1,66*	68	$<0,4$	$\uparrow\downarrow$
(G) G.D.	41 (m)	3	Frührezidiv	20	20	8,9	$<6,25$	$<0,4$	76	$<0,4$	$\uparrow\downarrow$
(H) C.P.	21 (w)	3	Frührezidiv	31	19	1,6	$<6,25$	1,5		$<0,4$	$\uparrow\downarrow$
(I) C.E.	28 (w)	3	Frührezidiv	36	12	7,2	$<6,25^*$	3,1*	53	$<0,4$	$\uparrow\downarrow$
(J) H.M.	67 (w)	3	Frührezidiv	37	13	6,5	$<6,25$	0,7	65	$<0,4$	$\uparrow\downarrow$
B.M.**	44 (w)	2	Rapide	3**	70	?	$<6,25$	0,6	$<6,25$	6,2	\uparrow
(A) M.A.	28 (w)	1	Rapide	5	22	0,8	$<6,25$	2,44	46	$<0,4$	\downarrow
(B) H.B.	58 (w)	1-2	Rapide	5	92	1,0	$<6,25$	1,5	55	$<0,4$	\downarrow
(C) Ah.M.	39 (w)	1	Rapide	5	12	0,7	$<6,25$	64	$<6,25$	9,8	\downarrow
(D) R.K.	37 (m)	1	Rapide	6	11	2,8	$<6,25$	0,54	30	$<0,4$	\downarrow
S.F.***	58 (m)	1	Rapide	9***	57	0,6	$<6,25$	$<0,4$	102		
(E) S.F.		1	Rapide	6	26	3,7	23	$<0,4$	97	$<0,4$	
(F) E.L.	47 (m)	1	Rapide	7	37	1,6	$<6,25$	0,65	13	$<0,4$	\downarrow
(G) G.S.	36 (m)	1	Rapide	8	35	1,5	$<6,25$	0,6	21	$<0,4$	\downarrow
(H) H.P.	54 (m)	1	Part. Rem.	9	10	1,3	$<6,25$	16	$<6,25$	5,0	\downarrow
(I) M.S.	30 (w)	1	Verzögert	12	56	2	49	$<0,4$	45	$<0,4$	
(J) T.H.	67 (w)	1	Verzögert	25	11	n.d.	$<6,25$	4,3	$<6,25$	52	\uparrow

*Proben aus dem Frührezidiv, da keine Blutprobe vor Beginn der PP-Therapie zur Verfügung stand (siehe Abb. 32 F, I)

** Die Patientin B.M. wurde nicht in der JWG Universitätsklinik Ffm behandelt. Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität erfolgte in unserem Labor mit den entsprechend zugeschickten Plasmaproben. Die Patientin wurde anfänglich mit der alleinigen FFP-Infusion therapiert. Nach unbefriedigender Response wurde 22 Tage nach Einweisung eine Plasmapheresetherapie eingeleitet, die einen umgehenden und anhaltenden Anstieg der Thrombozyten induzierte.

*** Der Patient S.F. wurde in seinem 1.Rezidiv aufgrund schwerer Shunt-Probleme nicht mit Plasmapherese sondern mit der alleinigen FFP-Infusion behandelt. Der Patient erhielt an 9 Tagen jeweils 4 Einheiten FFP (entspricht 0,8 l/Tag).

In 15 von 20 untersuchten TTP-Episoden (75%) bei 14/18 Patienten mit schwerem ADAMTS-13-Mangel wurde unter PP-Therapie eine enge Korrelation zwischen Thrombozytenanzahl und ADAMTS-13-Aktivität beobachtet.

In 11/20 TTP-Episoden induzierte die PP-Therapie einen beständigen und kontinuierlichen Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität und der Thrombozytenanzahl. Bei 5 von 10 Patienten mit einer TTP-Erstmanifestation (50%) wurde unter PP-Therapie nach initialem Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität ein transienter Abfall der ADAMTS-13-Aktivität mit korrespondierendem Anstieg des Inhibitortiters beobachtet. Dieser Anstieg des Inhibitortiters war mit einem erneuten Abfall der Thrombozyten und zumeist mit schweren neurologischen Symptomen assoziiert.

5/18 Patienten zeigten trotz hinreichender klinischer Response einen dauerhaften, schweren ADAMTS-13-Mangel im gesamten Verlauf der PP-Behandlung. Die PP-Therapie führte bei 3 von diesen 5 Patienten (M.A., Ah.M., H.P.) zu einer Erniedrigung des Inhibitortiters um 84-69% des Ausgangswertes. Bei zwei Patienten (T.H., B.M.) kam es unter PP-Therapie zu einem etwa 10fachen Anstieg des Inhibitortiters.

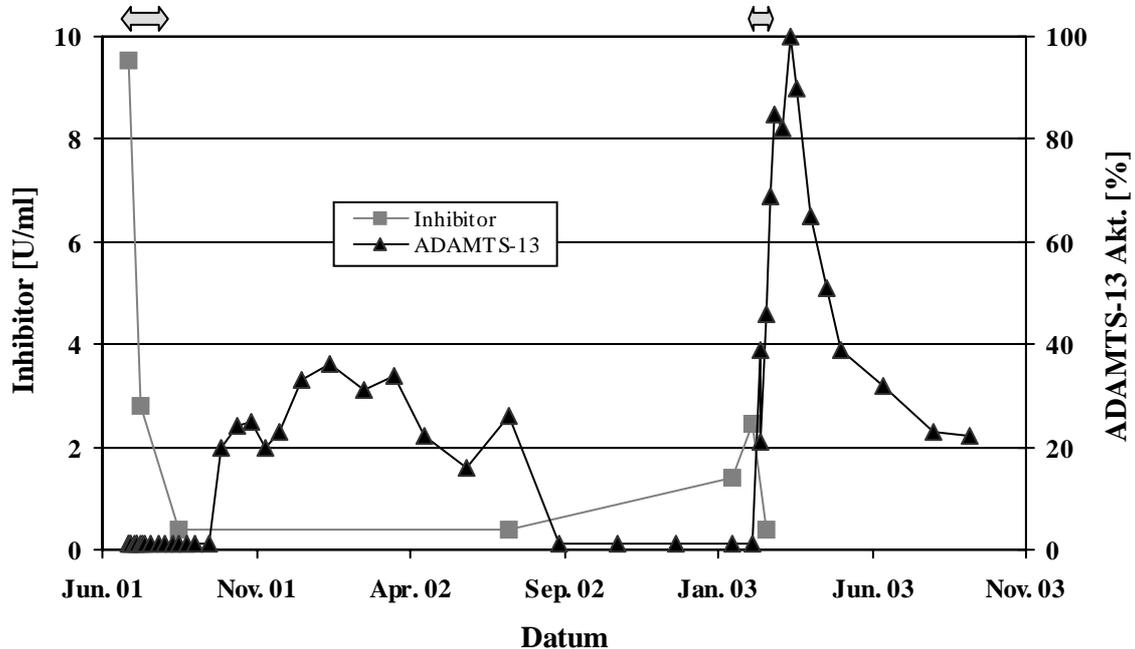
Überraschenderweise wird der klinische Verlauf der akuten TTP-Episode und die Response auf PP-Therapie (gemessen durch die Anzahl der notwendigen Behandlungen) weder vom Inhibitortiter, der Thrombozytenanzahl oder dem CRP-Spiegel bei Therapiebeginn noch von dem Alter der Patienten determiniert ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

3.2.4. Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter in Remission für Patienten mit permanenten und schweren ADAMTS-13-Mangel nach der PP-Therapie

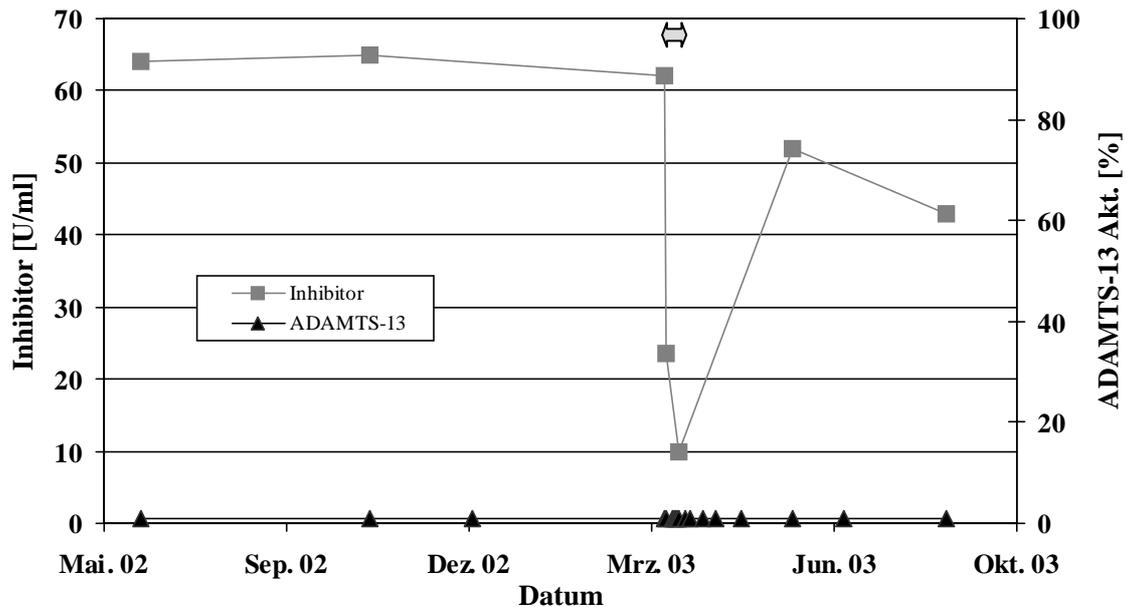
Bei 4/5 Patienten (M.A., Ah.M., T.H. und H.P.) mit einem permanenten und schweren ADAMTS-13-Mangel während der PP-Therapie konnte der Langzeitverlauf des Inhibitortiters und der ADAMTS-13-Aktivität in klinischer Remission beobachtet werden (Abb. 34). Die Patienten M.A. und Ah.M. (Abb. 34 A-B) erhielten nach dem Absetzen der PP- und der begleitenden Corticosteroid-Therapie keine weiterführende Behandlung. Die Patientin T.H. wurde aufgrund ihres ansteigenden Inhibitortiters am Tag 26 und am Tag 32 ihrer PP-Behandlung mit Rituximab (375 mg/m^2) behandelt (Abb. 34 C). Der Patient H.P. wurde im November 2001 splenektomiert (Abb. 34 D).

Abbildung 34: Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter in Remission für 4 Patienten mit schwerem ADAMTS-13-Mangel nach PP-Therapie

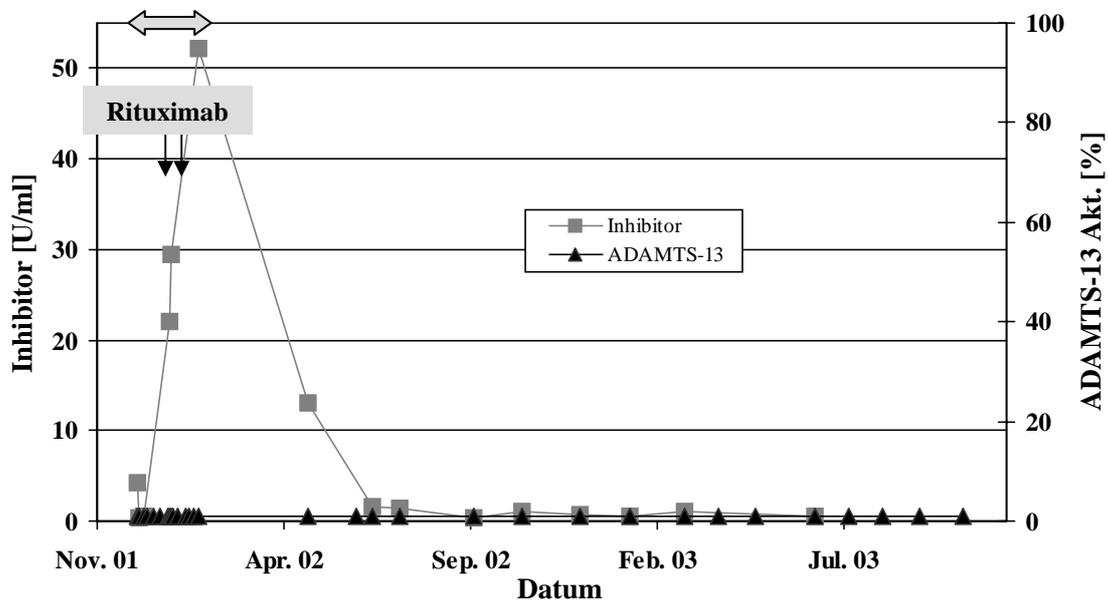
↔ = Dauer der Plasmapherese-Therapie bei akuter TTP



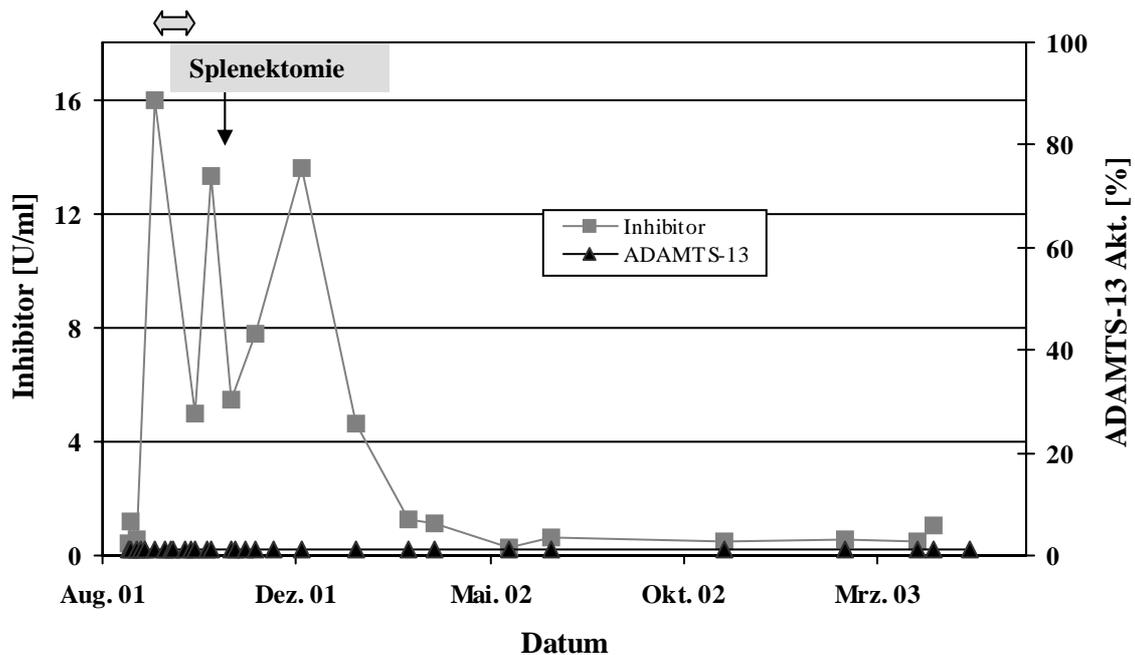
(A) Patientin M.A.: Gezeigt ist der Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter zwischen Juli 2001 und Oktober 2003. Die Patientin erkrankte mit 27 Jahren im Juli 2001 spontan an einer TTP. Analyse der ADAMTS-13-Aktivität zeigte eine hochgradig erniedrigte Enzymaktivität von <6,25% mit einem Inhibitortiter von 9,5 U/ml (siehe Abb. 32 C). Im Verlauf der PP-Behandlung erniedrigte sich der Inhibitortiter auf 2,4 U/ml, allerdings ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität. Im rezidivfreien Intervall zwischen Juli 2001 und Juli 2002 kam es zu einer spontanen Erniedrigung des Inhibitortiters auf undedektierbare Spiegel mit Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität auf durchschnittlich 26%. Zwischen Juli 2002 und Februar 2003 wurde ein erneuter Abfall der ADAMTS-13-Aktivität auf <6,25% mit einem Anstieg des Inhibitortiters auf 1,4 U/ml beobachtet. Der Anstieg des Inhibitortiters wurde im März 2003 von einer akuten TTP-Manifestation gefolgt. Die PP-Therapie in diesem TTP-Rezidiv (siehe Abb. 33 A) führte zu einer vollständigen Eliminierung des Inhibitors mit vorübergehenden Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität auf 70-100%. Von April 2003 bis Oktober 2003 kam es erneut zu einem Abfall der ADAMTS-13-Aktivität auf 22%.



(B) Patientin Ah.M.: Die Patientin Ah.M. erkrankte im Juni 1982 im Alter von 19 Jahren an einer TTP. Nach dem letzten Schwangerschafts-getriggerten Rezidiv im Dezember 1998 war die Patientin 51 Monate beschwerdefrei. Im März 2003 manifestierte sich bei der Patientin ohne erkennbaren Auslöser ein akutes TTP-Rezidiv (siehe Abb. 33 C). Die Patientin zeigte sowohl in klinischer Remission als auch bei der akuten Manifestation einen auffallend hohen Inhibitortiter von 62-65 U/ml. Die PP-Therapie im März 2003 führte zu einer Erniedrigung des Inhibitortiters auf 9,5 U/ml. In Remission kam es zwischen April und August 2003 zur spontanen Rückbildung des Inhibitors auf 52-43 U/ml.



(C) Patientin T.H.: Die Patientin T.H. erkrankte im Juni 1986 an einer TTP. Sie erlitt in den darauffolgenden Jahren 8 Rezidive. Im letzten Rezidiv (Dezember 2001/Januar 2002) wurde die Patientin aufgrund eines steigenden Inhibitortiters und nicht anhaltender Normalisierung der Thrombozytenanzahl unter PP-Therapie mit einer zweimaligen Gabe von Rituximab (375 mg/m^2) behandelt (siehe Abb. 33 J). In Remission kam es ohne messbare Rekonstitution von ADAMTS-13-Aktivität zu einer kontinuierlichen und anhaltenden Erniedrigung des Inhibitortiters auf $<0,4 \text{ U/ml}$ bis 1 U/ml .



(D) Patient H.P.: Der Patient H.P. erkrankte im Mai 1997 nach Ticlopidin-Gabe an einer TTP. In den darauffolgenden Jahren erlitt der Patient bis zum August 2001 9 TTP-Rezidive. Der Patient wurde aufgrund unvollständiger und nicht anhaltender Normalisierung der Thrombozytenanzahl in den rezidivfreien Intervallen zumeist mit 1-2 prophylaktischen, ambulanten PP-Behandlungen pro Woche behandelt. Der Patient zeigte einen stark schwankenden Inhibitor titer zwischen $<0,4$ U/ml bis zu 16 U/ml. Der Patient wurde aufgrund seines chronisch-rezidivierenden Verlaufes nach seinem letzten Rezidiv (siehe Abb. 33 H) im November 2001 splenektomiert. Die Splenektomie induzierte eine anhaltende klinische Remission ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität. Nach Splenektomie kam es zunächst zu einem transienten Anstieg des Inhibitor tites, welcher sich im weiteren Verlauf kontinuierlich auf $<0,4$ U/ml bis 1 U/ml erniedrigte.

Zusammenfassend zeigte eine Patientin (M.A.) in Remission eine spontane Erniedrigung des Inhibitor tites mit Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität auf 16-36%. Bei der Patientin Ah.M. kam es dagegen zu einer Rückbildung des Inhibitors auf 52-43 U/ml und erreichte damit 3 Monate nach ihrem Rezidiv eine ähnlich hohen Inhibitorspiegel wie vor bzw. bei ihrem Rezidiv. Die Patienten T.H. und H.P. zeigten eine kontinuierlichen Abfall des Inhibitor tites in Remission nach Rituximab-Gabe bzw. nach Splenektomie.

3.3. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit diversen hämatologischen Erkrankungen

Um die Spezifität des ADAMTS-13-Mangels für die TTP zu untersuchen, wurde die ADAMTS-13-Aktivität bei 108 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen (Kap. 2.3.2.) bestimmt. Die Abbildung 35 zeigt die ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit HUS, KMT oder Tumor assoziierter TMA, akuter Hämolyse unklarer Genese, ITP und APS. In der Abbildung 36 ist die ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit diversen, intensivpflichtigen und lebensbedrohlichen Erkrankungen dargestellt. In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

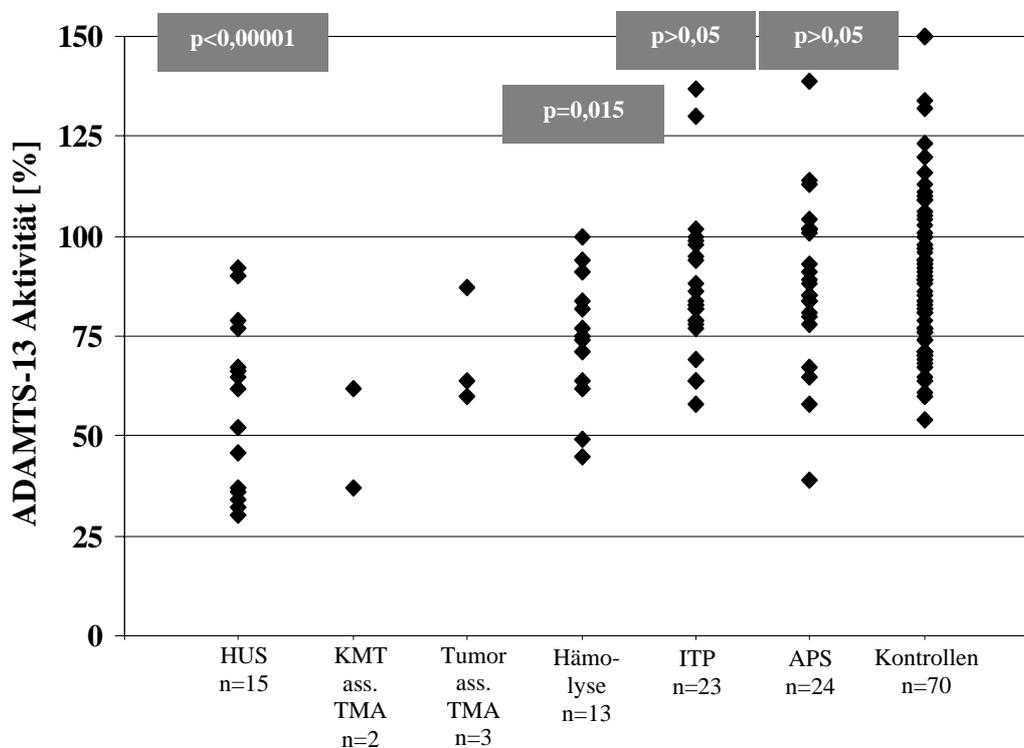


Abbildung 35: ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit HUS, KMT- oder Tumor assoziierter TMA, Hämolyse unklarer Genese, ITP und APS

Die Patientenkollektive mit $n \geq 13$ wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test mit der Kontrollgruppe verglichen.

HUS: Hämolytisch-uremisches Syndrom

KMT: Knochenmarkstransplantation

TMA: thrombotische Mikroangiopathie

ITP: idiopathische Thrombozytopenie

APS: Antiphospholipidsyndrom

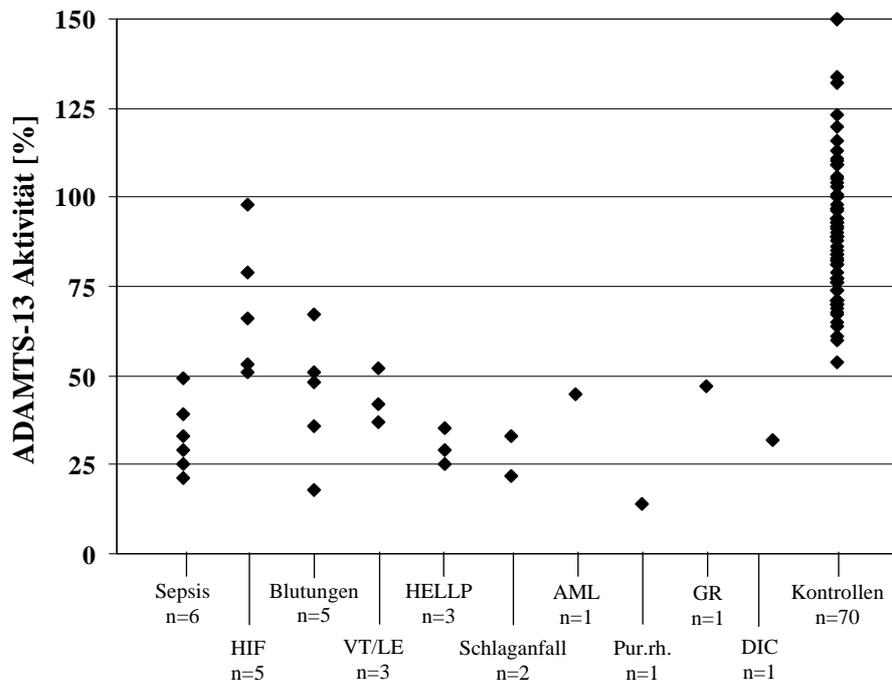


Abbildung 36: ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit diversen intensivpflichtigen Erkrankungen

HIF: Herzinfarkt

Blutungen: massive Blutungen bei erworbenem VWS (n=1), bei Hämophilie A (n=1), bei spontan erworbenem Hemmkörper gegen FVIII (n=1) und Blutungen nach OP (n=1) und nach Entbindung (n=1).

VT/LE: venöse Thrombosen („Catastrophic Antiphospholipid Syndrome“ (CAPS), Mesenterialvenenthrombose) und Lungenembolie (n=1)

HELLP: schwere Komplikation der Schwangerschaftsgestose mit „hemolysis elevated liver enzymes und low platelets“

AML: akute, myeloische Leukämie

Pur.rh.: Purpura rheumatica

GR: „graft rejection“ nach Nierentransplantation

DIC: Verbrauchskoagulopathie („disseminated intravascular coagulation“)

Die 108 untersuchten Patienten mit verschiedenen, hämatologischen Erkrankungen zeigten eine ADAMTS-13-Aktivität zwischen 14 und 139%. Keiner der Patienten zeigte somit einen schweren ADAMTS-13-Mangel (<6,25%). Ein milder ADAMTS-13-Mangel fand sich dagegen bei 7/15 Patienten (47%) mit HUS; bei 1/2 Patienten (50%) mit KMT assoziierter TMA; bei 2/13 Patienten (15%) mit Hämolyse unklarer Genese, bei 1/23 Patienten (4%) mit APS und bei 23/28 Patienten (82%) mit diversen intensivpflichtigen Erkrankungen (6/6 Patienten mit Sepsis; 2/5 Patienten mit Herzinfarkt und bei den untersuchten Patienten mit thromboembolischen Ereignissen; HELLP-Syndrom; ischämischem Schlaganfall; AML; Purpura rheumatica; Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation und DIC). Statistisch ergibt sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine hoch signifikant erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität bei den Patienten mit HUS und den Patienten mit den diversen, intensivpflichtigen Erkrankungen ($p < 0,00001$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Die Patienten mit einer Hämolyse unklarer Genese zeigten im Vergleich zum Normalkollektiv eine schwach signifikant erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität ($p = 0,015$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 10: ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen

Die Patientenkollektive mit $n \geq 13$ wurden mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Testes (U-Test) mit dem Normalkollektiv III verglichen.

HUS: hämolytisch urämisches Syndrom; KMT ass. TMA: Knochenmarkstransplantations-assoziierte thrombotische Mikroangiopathie; Hämolyse: Hämolyse unklarer Genese; ITP: idiopathische Thrombozytopenie; APS: Antiphospholipid-Syndrom; intensivpflichtige E.: diverse, intensivpflichtige Erkrankungen (s. Abb. 36).

Diagnose	Anzahl	m/w	Alter [Jahre] MW±SD; Bereich	ADAMTS-13 Akt. [%] MW±SD; Bereich	U-Test
HUS	15	8/7	39 ± 18; 7-68	58 ± 21; 30-92	$p < 0,00001$
KMT ass. TMA	2	1/1	40 ± 4; 37-43	50 ± 18; 37-62	
Tumor ass. TMA	3	2/1	39 ± 13; 27-53	70 ± 15; 60-87	
Akute Hämolyse	13	5/8	48 ± 17; 16-76	74 ± 16; 45-100	$p = 0,015$
ITP	23	9/14	44 ± 19; 19-77	87 ± 19; 58-137	$p > 0,05$
APS	24	13/11	48 ± 19; 24-80	90 ± 20; 39-139	$p > 0,05$
intensivpflichtige E.	28	16/12	48 ± 17; 19-75	42 ± 19; 14-98	$p < 0,00001$
Normalkollektiv III	70	35/35	45 ± 15; 21-72	91 ± 21; 54-150	

5 Patienten mit intensivpflichtigen Erkrankungen und reduzierter ADAMTS-13-Aktivität konnten nochmals in Remission untersucht werden. Alle Patienten zeigten ein Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität (Abb. 37).

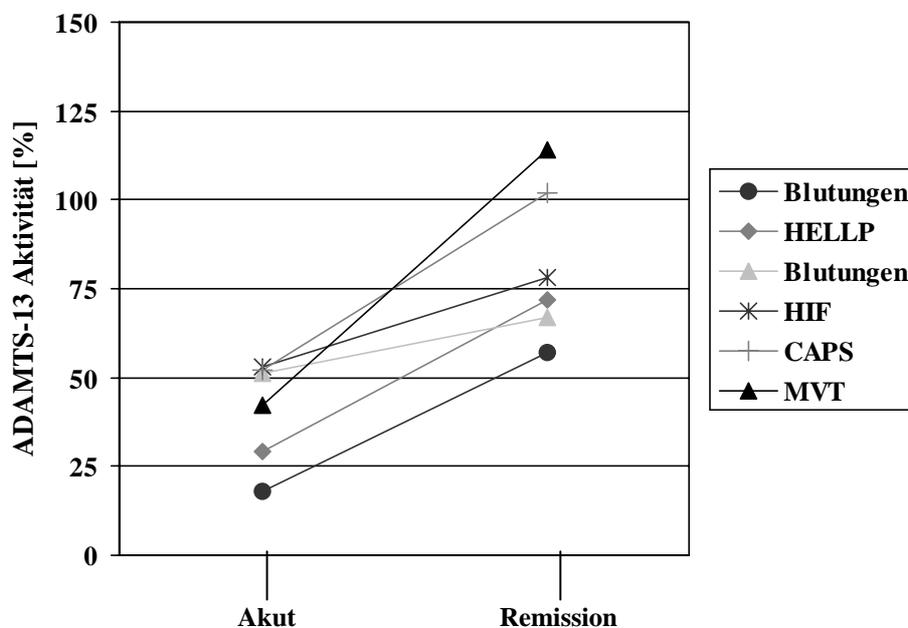


Abbildung 37: Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität in Remission

Die Abbildung zeigt die ADAMTS-13-Aktivität für 2 Patienten mit schweren Blutungen, 1 Patient mit HELLP-Syndrom, 1 Patient mit Herzinfarkt, 1 Patient mit CAPS („catastrophic antiphospholipid syndrome“) und 1 Patient mit Mesenterialvenenthrombose (MVT) in akuten Krankheitsstadium und in Remission.

3.4. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und Malignität zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei 60 Patienten mit benignen oder malignen Hirntumoren (Kap. 2.3.3) untersucht. Des weiteren wurde die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei 20 Patienten mit lokalen oder metastasierenden Prostatatumoren (Kap. 2.3.3.) analysiert. In den Kapiteln 3.4.1.–3.4.2. werden die entsprechenden Patientenkollektive mit dem Alters- und Geschlechts-angepasstem Normalkollektiv II (Kap. 2.2.2.) verglichen. Im Kapitel 3.4.3. wird der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, VWF:Ag und dem Lebensalter der Patienten und gesunden Probanden dargestellt.

3.4.1. ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten mit Hirntumoren

Die Tabelle 11 und Abbildung 38 zeigt die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei 30 Patienten (m/w=10/20) mit benignen Hirntumoren (Meningeome WHO-GI, Meningeome WHO-GII, Hypophysen-Tumore und Oligodendrogliom WHO-GII), bei 30 Patienten (m/w=10/20) mit malignen Hirntumoren (Glioblastome WHO-GIII, Glioblastome WHO-GIV, Intracerebrale Metastasen, Meningeome WHO-GIII) und bei 30 gesunden Probanden mit vergleichbarer Alters- und Geschlechterverteilung.

2/30 Patienten (7%) mit benignen Hirntumoren und 7/30 Patienten (23%) mit malignen Hirntumoren zeigten, im Vergleich zu dem Alters- und Geschlechts-angepassten Normalkollektiv, einen milden ADAMTS-13-Mangel mit Enzymaktivitäten zwischen 40 und 59%. Statistisch ergibt sich nur für das Patientenkollektiv mit malignen Hirntumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität ($p=0,007$; Zweistichproben t-Test). Zwischen den Patienten mit benignen und malignen Hirntumoren besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der ADAMTS-13-Aktivität. Die Patienten mit malignen Hirntumoren zeigten einen signifikant höheren VWF:Ag-Spiegel als die Patienten mit benignen Hirntumoren ($p=0,018$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 11: ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten mit Hirntumoren

Histologische Diagnose	Anzahl	m/w	Alter [Jahre] MW±SD; Bereich	ADAMTS-13 Akt. [%] MW±SD; Bereich	VWF:Ag [%] MW±SD; Bereich
Benigne Tumore	30	10/20	55 ± 12; 34-75	80 ± 17; 40-114	134 ± 68; 45-306
Maligne Tumore	30	10/20	58 ± 8; 41-74	74 ± 19; 42-121	197 ± 105; 72-400
Kontrollen	30	10/20	60 ± 11; 36-72	86 ± 18; 61-134	124 ± 48; 57-244

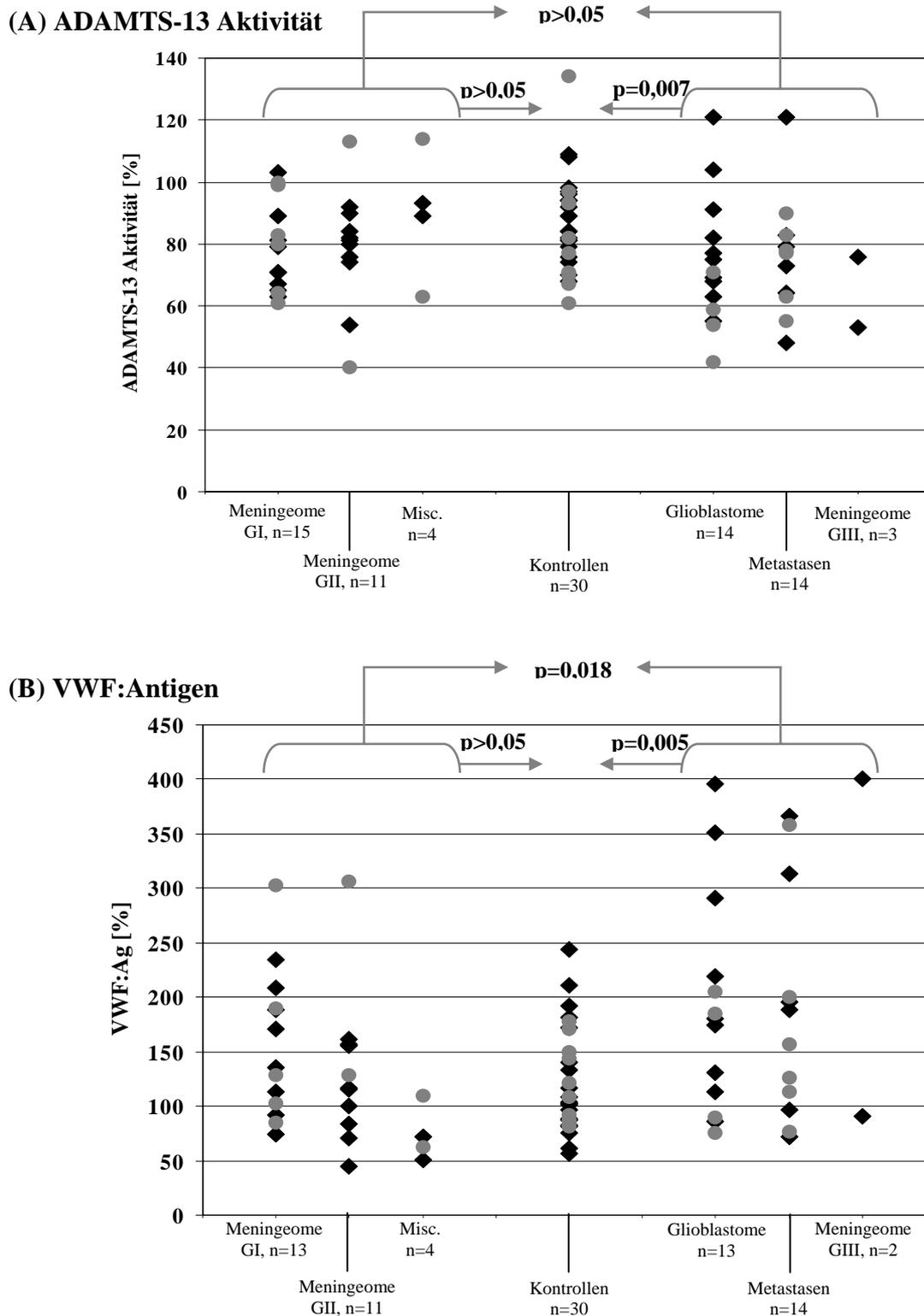


Abbildung 38: ADAMTS-13-Aktivität (A) und VWF:Ag (B) bei Patienten mit Hirntumoren

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte für die ADAMTS-13-Aktivität mit dem parametrischem Zweistichproben t-Test und für das VWF:Ag mit dem nicht-parametrischem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

Graue Kreise: Männer (n=20); Schwarze Rauten: Frauen (n=40)

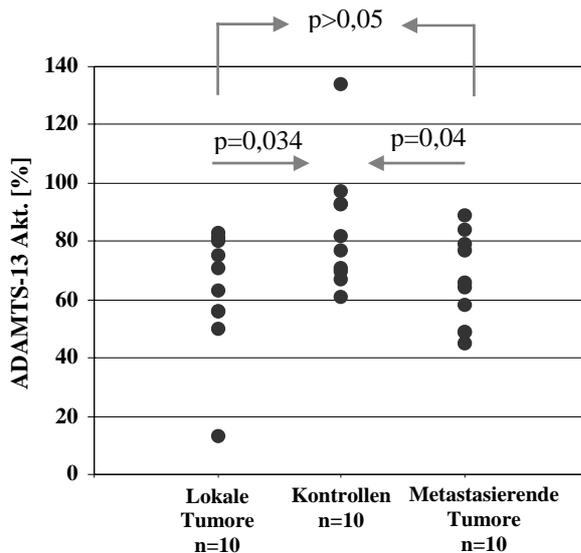
Misc. : 3 Patienten mit Hypophysentumoren und 1 Patient mit einem Oligodendrogliom WHO-GII

Zwei Patienten mit Meningeomen (WHO-GI) und ein Patient mit einem Glioblastom präsentierten ein mildes Von Willebrand Syndrom, Typ I und wurden demzufolge bei der Analyse des VWF:Antigens ausgeschlossen.

3.4.2. ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten mit Prostatatumoren

Die Abbildung 39 und die Tabelle 12 zeigt die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei 10 Patienten mit lokalen Prostatatumoren, 10 Patienten mit metastasierenden Prostatatumoren und 10 gesunden Probanden mit vergleichbarer Altersverteilung.

(A) ADAMTS-13-Aktivität



(B) VWF:Ag

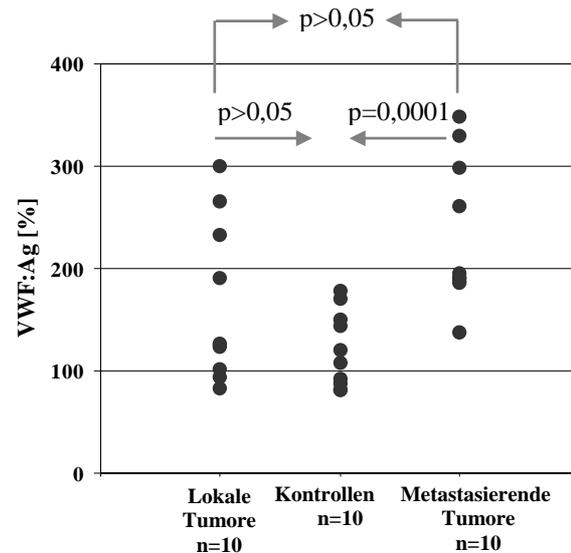


Abbildung 39: ADAMTS-13-Aktivität (A) und VWF:Ag (B) bei Patienten mit Prostatatumoren

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte für die ADAMTS-13-Aktivität mit dem parametrischem Zweistichproben t-Test und für das VWF:Ag mit dem nicht-parametrischem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 12: ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten mit Prostatatumoren

Histologische Diagnose	Anzahl	Alter [Jahre] MW±SD; Bereich	ADAMTS-13 Akt. [%] MW±SD; Bereich	VWF:Ag [%] MW±SD; Bereich
Lokale Tumore	10	65 ± 8; 51-79	63 ± 21; 13-83	174 ± 72; 93-300
Metastasen	10	65 ± 7; 52-74	66 ± 16; 45-89	233 ± 72; 137-349
Kontrollen	10	65 ± 5; 57-72	85 ± 21; 61-134	121 ± 37; 81-178

Unter den Patienten mit Prostatatumoren zeigten 4/10 Patienten (40%) mit lokalen Tumoren und 4/10 Patienten mit metastasierenden Tumoren (40%) im Vergleich zur Kontrollgruppe einen milden ADAMTS-13-Mangel mit Enzymaktivitäten zwischen 13 und 58%. Für beide Patientenkollektive ergibt sich in der statistischen Analyse eine signifikant erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,034$ und $p=0,04$; Zweistichproben t-Test). Die ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit lokalen Tumoren

unterscheidet sich dabei nicht signifikant von der Enzymaktivität bei Patienten mit metastasierenden Tumoren. Patienten mit metastasierenden Tumoren zeigten im Gegensatz zu Patienten mit lokalen Tumoren ein signifikant erhöhtes VWF:Ag ($p=0,0001$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind bei den geringen Fallzahlen jedoch nur begrenzt aussagekräftig.

3.4.3. Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, VWF:Ag und dem Lebensalter bei Patienten mit malignen Erkrankungen und gesunden Probanden

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, VWF:Ag und dem Lebensalter zu untersuchen, wurde die Daten mittels der nicht-parametrischen Spearman-Rang Korrelation analysiert. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die Altersabhängigkeit der ADAMTS-13-Aktivität und des VWF:Antigens. In der Abbildung 42 wird die Korrelationsanalyse zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag dargestellt.

Die statistische Analyse der Ergebnisse zeigt eine schwache, aber deutlich signifikante Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem Lebensalter der untersuchten Individuen ($r=-0,33$; $p=0,0005$; Spearman-Rang-Korrelation). Das VWF:Ag zeigt demgegenüber keine signifikante Altersabhängigkeit ($p>0,05$; Spearman-Rang-Korrelation). In den untersuchten Kollektiven besteht keine signifikante Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag ($p>0,05$; Spearman-Rang-Korrelation).

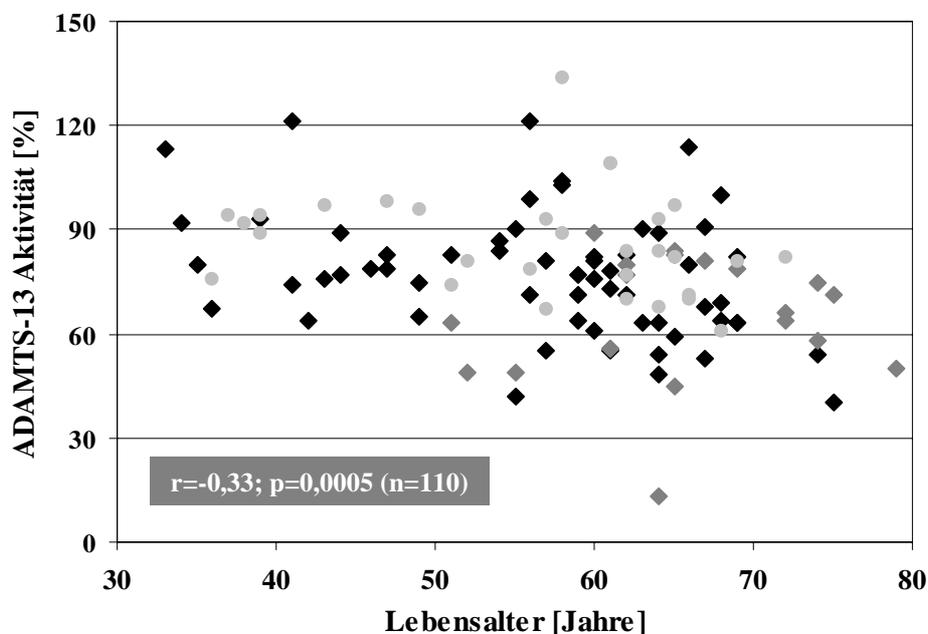


Abbildung 40: Die Altersabhängigkeit der ADAMTS-13-Aktivität

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit malignen und benignen Hirntumoren ($n=60$)

Graue Rauten: Patienten mit lokalen und metastasierenden Prostatatumoren ($n=20$)

Graue Kreise: Kontrollen ($n=30$)

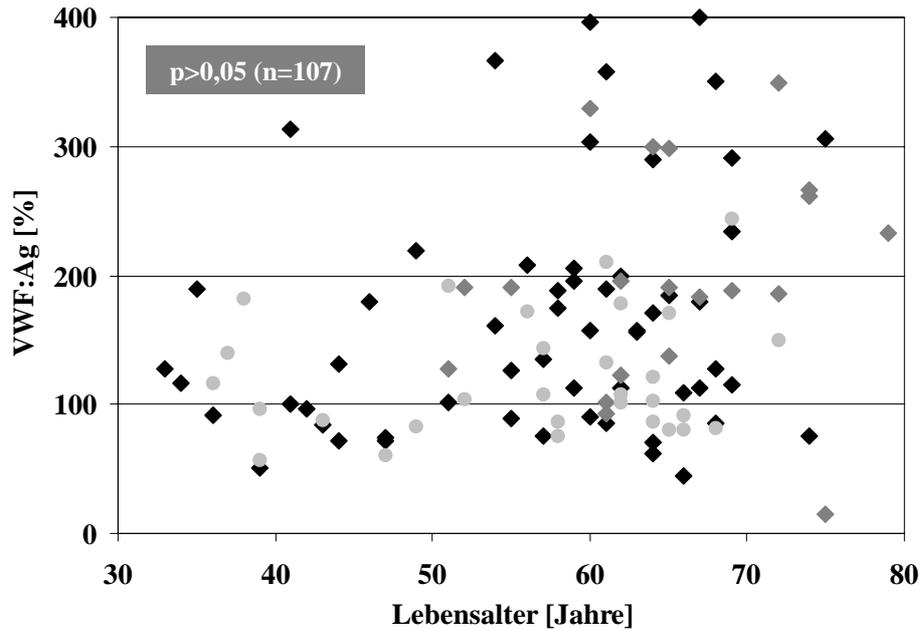


Abbildung 41: Die Altersabhängigkeit des VWF:Antigens

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit malignen und benignen Hirntumoren (n=60)

Graue Rauten: Patienten mit lokalen und metastasierenden Prostatatumoren (n=20)

Graue Kreise: Kontrollen (n=30)

Zwei Patienten mit Meningeomen (WHO-GI) und ein Patient mit einem Glioblastom wurden aufgrund eines milden Von Willebrand Syndromes, Typ I bei der Analyse ausgeschlossen.

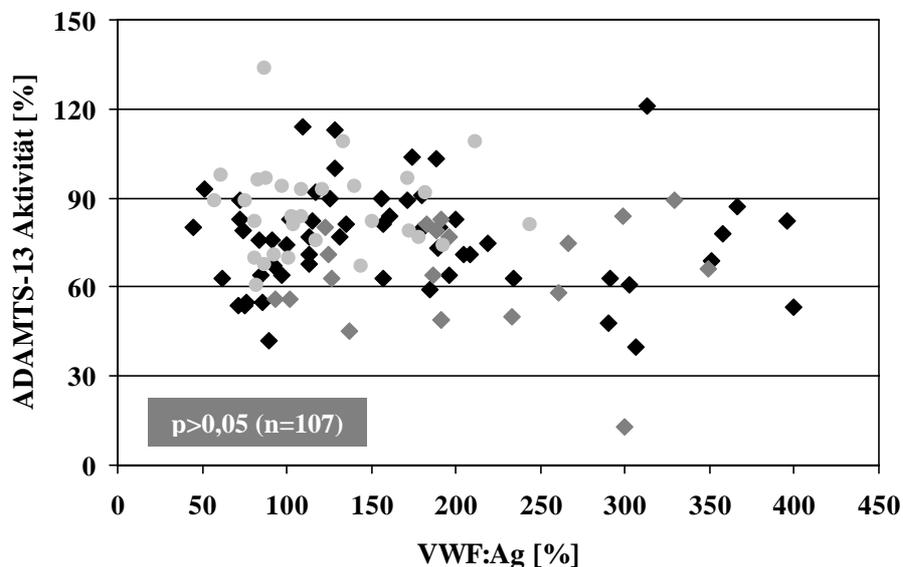


Abbildung 42: Korrelationsanalyse für die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit malignen und benignen Hirntumoren (n=57)

Graue Rauten: Patienten mit lokalen und metastasierenden Prostatatumoren (n=20)

Graue Kreise: Kontrollen (n=30)

Zwei Patienten mit Meningeomen (WHO-GI) und ein Patient mit einem Glioblastom wurden aufgrund eines milden Von Willebrand Syndromes, Typ I bei der Analyse ausgeschlossen.

3.5. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und arteriellen bzw. venösen Thrombosen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei 70 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen (Kap. 2.3.4.) und 70 Patienten mit venösen Thrombosen (Kap. 2.3.4) bestimmt. Im folgenden Kapitel werden die Patientenkollektive mit dem Alters- und Geschlechts-angepasstem Normalkollektiv III (Kap. 2.2.3.) verglichen. Im Kapitel 3.5.2. werden die entsprechenden Kollektive auf mögliche Korrelationen zwischen ADAMTS-13, VWF:Ag und Lebensalter hin überprüft. Im Kapitel 3.5.3. werden die molekulargenetischen Ergebnisse für eine ausgewählte Patientin mit neu Schlaganfällen und einer erniedrigten ADAMTS-13-Aktivität dargestellt.

3.5.1. ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen

Die Tabelle 13 und die Abbildung 43 zeigen die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag bei den untersuchten Patientenkollektiven und der entsprechenden Kontrollgruppe. 2/70 Patienten (2,8%) mit ischämischen Schlaganfällen und 1/70 Patient (1,4%) mit tiefer Beinvenenthrombose zeigten, im Vergleich zu dem Alters- und Geschlechtsangepasstem Normalkollektiv, einen milden ADAMTS-13-Mangel mit Enzymaktivitäten zwischen 17 und 44%. Statistisch ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der ADAMTS-13-Aktivität zwischen den Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und den Patienten mit venösen Thrombosen ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte das Patientenkollektiv mit venösen Thrombosen eine schwach signifikante Erhöhung der ADAMTS-13-Aktivität ($p = 0,03$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Im Gegensatz dazu zeigten beide Patientenkollektive im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich signifikante Erhöhung des VWF:Ag-Spiegels ($p = 0,008$ und $p = 0,00004$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Für das VWF:Ag findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Schlaganfällen und venösen Thrombosen ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Für die Patientin mit ischämischen Schlaganfällen und einer herausragend niedrigen ADAMTS-13-Aktivität von 17% wurde eine ADAMTS13-Genanalyse durchgeführt, um zu klären, ob die Patientin einen congenitalen ADAMTS-13-Mangel aufweist (Kap. 3.5.3.).

Tabelle 13: ADAMTS-13-Aktivität und VWF:Ag bei Patienten ischämischen Schlaganfällen und venösen Thrombosen (VT)

Diagnose	Anzahl	m/w	Alter [Jahre] MW±SD; Bereich	ADAMTS-13-Akt. [%] MW±SD; Bereich	VWF:Ag [%] MW±SD; Bereich
Schlaganfall	70	35/35	46 ± 16; 20-71	93 ± 25; 17-150	140 ± 50; 54-305
VT	70	35/35	49 ± 14; 20-72	99 ± 25; 41-152	159 ± 66; 72-400
Kontrollen	70	35/35	45 ± 15; 21-72	91 ± 21; 54-150	120 ± 42; 48-244

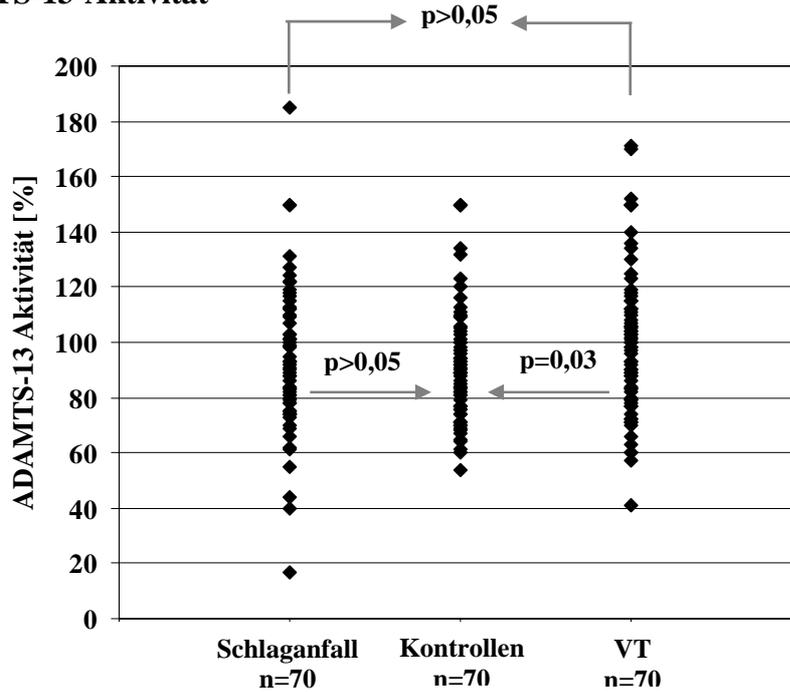
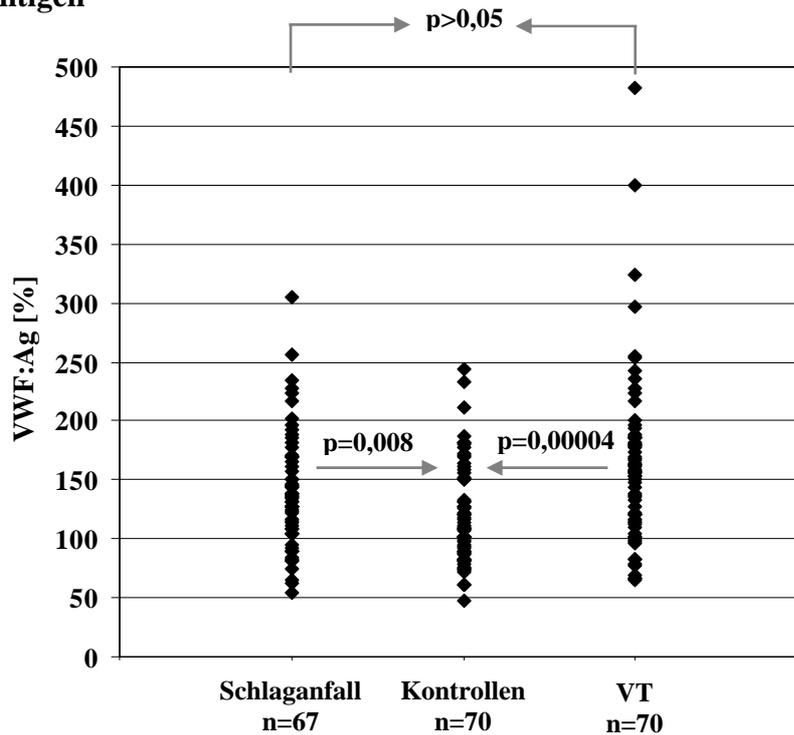
(A) ADAMTS-13-Aktivität**(B) VWF:Antigen**

Abbildung 43: ADAMTS-13-Aktivität (A) und VWF:Ag (B) bei Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und venösen Thrombosen (VT)

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte für die ADAMTS-13-Aktivität und für das VWF:Ag mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

3 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen wurden bei Verdacht auf ein mildes Von Willebrand Syndrom, Typ I bei der Analyse des VWF:Antigens ausgeschlossen.

3.5.2. Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, VWF:Ag und Lebensalter bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen und gesunden Probanden

Um den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität, VWF:Ag und dem Lebensalter zu untersuchen, wurden die Daten mittels der nicht-parametrischen Spearman-Rang Korrelation analysiert. Die Abbildungen 44 und 45 zeigen die Altersabhängigkeit der ADAMTS-13-Aktivität und des VWF:Antigens. In der Abbildung 46 wird die Korrelationsanalyse zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag dargestellt.

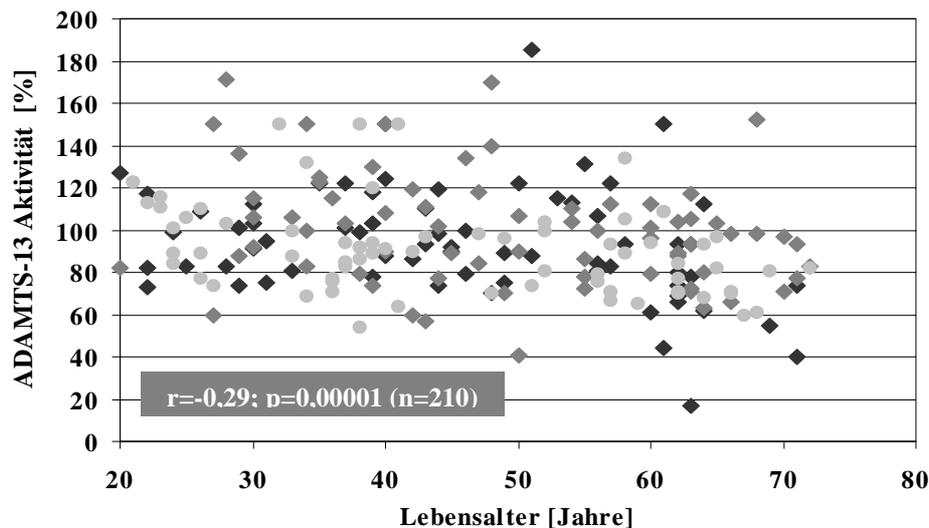


Abbildung 44: Die Altersabhängigkeit der ADAMTS-13-Aktivität

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit ischämischen Schlaganfällen (n=70), Graue Rauten: Patienten mit venösen Thrombosen (n=70), Graue Kreise: Kontrollen (n=70)

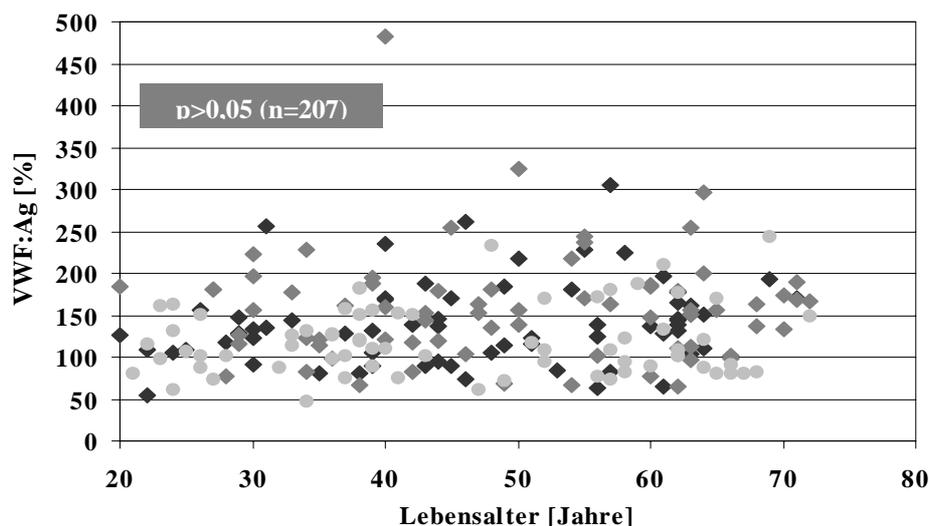


Abbildung 45: Die Altersabhängigkeit des VWF:Antigens

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit ischämischen Schlaganfällen (n=67), Graue Rauten: Patienten mit venösen Thrombosen (n=70), Graue Kreise: Kontrollen (n=70)

3 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen wurden bei Verdacht auf ein mildes Von Willebrand Syndrom, Typ I bei der Analyse des VWF:Antigens ausgeschlossen.

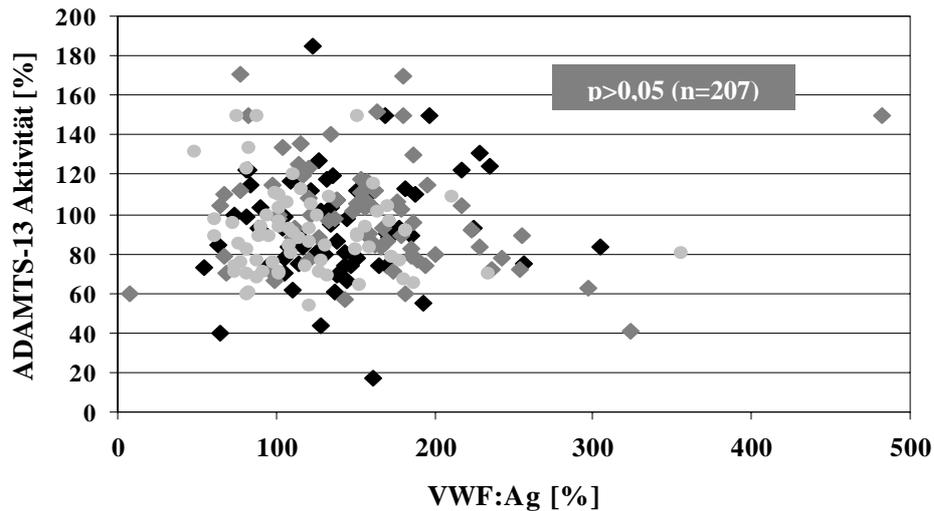


Abbildung 46: Korrelationsanalyse für die ADAMTS-13-Aktivität und das VWF:Ag

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der Spearman-Rang-Korrelation.

Schwarze Rauten: Patienten mit ischämischen Schlaganfällen (n=67), Graue Rauten: Patienten mit venösen Thrombosen (n=70), Graue Kreise: Kontrollen (n=70)

3 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen wurden bei Verdacht auf ein mildes Von Willebrand Syndrom, TypI ausgeschlossen.

Die statistische Analyse der Ergebnisse zeigt eine schwache, aber deutlich signifikante Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem Lebensalter der untersuchten Individuen ($r=-0,29$; $p=0,000015$; Spearman-Rang-Korrelation). Untersucht man die 3 Kollektive im einzelnen ergeben sich bei der Korrelationsanalyse folgende Werte: $r=-0,33$; $p=0,0048$ für Patienten mit ischämischen Schlaganfällen; $r=-0,27$; $p=0,023$ für Patienten mit venösen Thrombosen und $r=-0,378$; $p=0,0013$ für gesunde Probanden. Der signifikante Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem Lebensalter bestätigt sich somit in den einzelnen Gruppen und scheint demnach nicht von der Erkrankung der untersuchten Personen abhängig zu sein. Im Vergleich zur ADAMTS-13-Aktivität ergibt sich keine signifikante Korrelation zwischen dem VWF:Ag und dem Lebensalter der untersuchten Individuen ($p>0,05$; Spearman-Rang-Korrelation). In den untersuchten Kollektiven zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag ($p>0,05$; Spearman-Rang-Korrelation).

3.5.3. Molekulargenetische Untersuchungen für eine ausgewählte Patientin mit ischämischen Schlaganfällen und einer reduzierten ADAMTS-13-Aktivität

Die Patientin S.W. (weiblich, 62 Jahre) zeigte eine herausragend niedrige ADAMTS-13-Aktivität von 17% (Abb. 43). Das Ergebnis wurde durch eine zweite Blutentnahme 11 Monate später bestätigt. Um zu untersuchen, ob bei der Patientin ein congenitaler ADAMTS-13-Mangel vorliegt, wurde eine Familienuntersuchung der Patientin und eine ADAMTS-13 Genanalyse veranlasst. Für die Familienuntersuchung stand nur der Sohn der Patientin zur

Verfügung (S.J., 33 Jahre), er zeigte eine grenzwertig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität von 56% (Normalbereich: 54-150%). Für die ADAMTS-13 Genanalyse wurde die genomische DNA der peripheren Lymphocyten der Patientin und des Sohnes auf Mutationen im ADAMTS13-Gen hin untersucht. Dazu wurden alle 29 Exons von ADAMTS13 mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Kap. 2.8.). Die Mutationsanalyse zeigte jeweils einen Nucleotid-Austausch in Exon 1; 9; 12; 16 und 18 (Tab. 14). Die Patientin trägt die Punktmutationen im Exon 1, 12, 16 und 18 auf beiden Allelen, während sie für den Nucleotidaustausch im Exon 9 heterozygot ist. Der Sohn ist für die Mutation in Exon 12 homozygot und für alle übrigen Mutationen heterozygot. Die Punktmutationen im Exon 1, 12, 16 und 18 wurden von Levy et al. [2001] bereits als „single-nucleotide polymorphisms“ (SNPs) identifiziert. Antoine et al. [2003] konnte dies für die 19 C→T, 1342 C→G und 1852 C→G SNPs bestätigen (Tab. 14). Da Antoine et al. unter 230 untersuchten Allelen der Normalbevölkerung keinen 2195 C→T Austausch finden, handelt es sich hier wahrscheinlich um einen selten vorkommenden SNP.

Tabelle 14: Mutationen im ADAMTS13-Gen bei der Patientin S.W. (A) und ihrem Sohn S.J. (B)

++ = homozygote(r) Mutation/SNP; + = heterozygote(r) Mutation/SNP

Vorkommen in der Normalbevölkerung nach Antoine et al. [2003]¹ und Schneppenheim et al. [2003]² = Die prozentuale Häufigkeit der entsprechenden SNPs und die Anzahl der untersuchten Allele.

* Levy et al. [2001] identifizierten den 2195 C→T Austausch im Gegensatz zu Antoine et al. [2003] als SNP

(A) Patientin S.W. (weiblich, 62 Jahre) mit rezidivierenden, ischämischen Schlaganfällen

Exon	Nucleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Mutation	Vorkommen in der Normalbevölkerung
1	19 C→T	7 R→W	++	10% (n=120) ¹
9	1058 C→T	353 P→L	+	0% (n=100) ²
12	1342 C→G	448 Q→E	++	42,5% (n=120) ¹
16	1852 C→G	618 P→A	++	9,2% (n=120) ¹
18	2195 C→T	732 A→V	++	0% (n=230) ^{1*}

(B) Sohn der Patientin S.W. (S.J., 33 Jahre)

Exon	Nucleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Mutation
1	19 C→T	7 R→W	+
9	1058 C→T	353 P→L	+
12	1342 C→G	448 Q→E	++
16	1852 C→G	618 P→A	+
18	2195 C→T	732 A→V	+

Die Abbildung 47 zeigt die Verteilung der Mutationen bzw. der SNPs im ADAMTS-13 Protein.

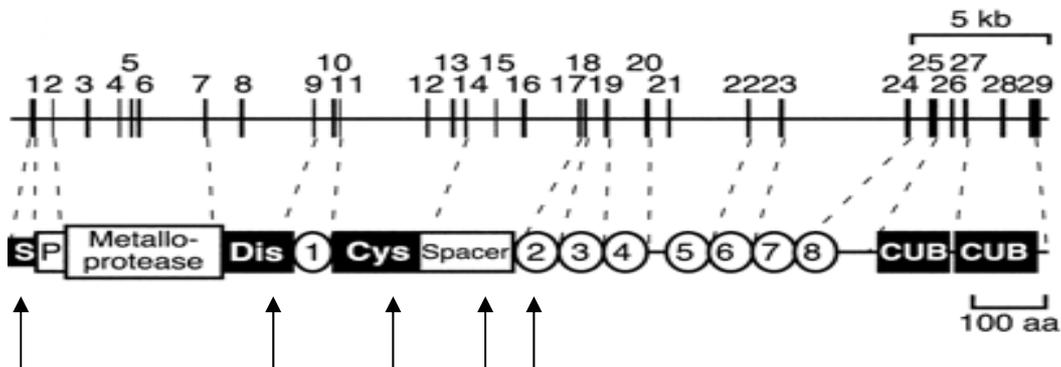


Abbildung 47: Lokalisation der Mutation und der SNPs von der Patientin S.W. im ADAMTS-13 Protein

Die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Orte mit einem Aminosäure-Austausch im ADAMTS13-Gen der Patientin.

Abbildung der ADAMTS-13 Struktur aus Zheng et al. [2001]

Die Funktion der verschiedenen Proteindomänen von ADAMTS-13 ist mit Ausnahme der Metalloprotease-Domäne nicht bekannt. Inwieweit die hier gefundenen Mutationen die Funktion von ADAMTS-13 beeinflussen ist demzufolge nicht nachvollziehbar. Um dies zu untersuchen, werden zur Zeit die Mutation und die SNPs der Patientin S.W. in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Scheiflinger (Baxter BioScience in Orth, Österreich) durch in-vitro Mutagenese in eine full-length ADAMTS-13 cDNA eingebaut und in HEK 293 („human embryonic kidney fibroblasts“; ATCC CRL-1573) Zellen expremiert.

Neben den Mutationen, welche zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, wurden im Exon 5 und 6 sogenannte „stille“ Punktmutationen gefunden (Tab. 15).

Tabelle 15: Stille Punktmutationen im ADAMTS13-Gen bei der Patientin S.W. und deren Sohn S.J.

++ = homozygote Mutation; + = heterozygote Mutation

Exon	Nucleotid-Austausch	Mutation bei S.W.	Mutation bei S.J.
5	3500 C→T	++	+
6	3798 C→T	++	+

4. Diskussion

4.1. Diskussion zur Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst erfolgreich die herkömmliche Immunoblotting-Methode nach Furlan et al. [1996] im Labor der hämostaseologischen Ambulanz der JWG Universitätsklinik Frankfurt am Main aufgebaut. Die wichtigsten Modifikationen gegenüber der publizierten Methode sind:

- die Verwendung eines anderen VWF-Substrates und
- die Durchführung der Reaktion ohne Dialyse bei Verwendung eines niedrigmolaren Reaktionspuffers ohne NaCl₂.

Furlan et al. [1996] reinigte den VWF aus Kryopräzipitat durch Gelfiltration mit Sepharose CL-2B. Die ersten Fraktionen sind frei von Proteaseaktivität und werden als Substrat für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität verwendet. Das hier benutzte Substrat ist ein hochgereinigtes VWF-Konzentrat von LFB Frankreich („Concentre de Facteur Willebrand Humain Tres Haute Purite“ von Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnologies, Lille, Frankreich), welcher in Frankreich und anderen europäischen Ländern für die Behandlung von VWS-Patienten eingesetzt wird. Allford et al. [2000] konnte zeigen, dass das VWF-Konzentrat keine endogene ADAMTS-13-Aktivität enthält und somit als Substrat für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität gebraucht werden kann.

Da die ADAMTS-13-katalysierte VWF-Proteolyse sehr stark von den Pufferbedingungen abhängig ist (Kap. 1.4.1.), erfolgt die Reaktion üblicherweise auf einer Dialysemembran [Furlan et al. 1996; Tsai 1996; Obert et al. 1999; Allford et al. 2000]. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion aus folgenden Gründen ohne Dialyse durchgeführt:

- Die Reaktion auf der Dialysemembran zeigte unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine signifikante Verbesserung der VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13.
- Die Durchführung des Testes ist ohne das Übertragen des Reaktionsgemisches auf die Dialysemembran schneller und einfacher.
- Die Dialyse führt zu einer Protein-abhängigen Veränderung des Reaktionsvolumens, der nach der Reaktion wieder ausgeglichen werden sollte.

Die Ergebnisse (Kap. 4.1.) zeigen, dass bei Verwendung eines niedrigmolaren Reaktionspuffers (5 mmol/l Tris-HCl) ohne NaCl₂ die ADAMTS-13-Aktivität auch ohne Dialyse bestimmt werden kann. Die Möglichkeit dieser Vereinfachung wurde später auch von einer anderen Arbeitsgruppe dokumentiert [Mori et al. 2002].

Die Spezifität der so gemessenen VWF-Proteolyse wurde nachgewiesen, indem gezeigt wurde, dass

- die Reaktion durch NaCl und EDTA inhibiert wird,
- die Reaktion von der Zugabe divalenter Kationen abhängig ist und
- der Serinproteaseinhibitor Pefabloc-SC die Reaktion nicht hemmt.

Die Erstellung eines Normalbereiches entscheidet grundlegend über die Qualität eines Verfahrens. Falls unter den getesteten Normalpersonen mehrere Proben einen Aktivitätsmangel aufweisen, ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Der Mangel an dem untersuchten Enzym ist unter der normalen und gesunden Bevölkerung weit verbreitet und es besteht somit keine strenge Assoziation zu einer klinischen Symptomatik.
- Das verwendete Verfahren produziert falsch positive Resultate und ist damit für weitere Studien nicht verwertbar.

Bei der Studie von Moore et al. [2001] wird z.B. bei 2 von 20 getesteten Normalpersonen ein ADAMTS-13-Mangel detektiert. Da in anderen Studien die weite Verbreitung eines ADAMTS-13-Mangels nicht gefunden werden konnte (Tsai 1996; Obert et al. 1999; Mori et al. 2002], liegt es nahe zu vermuten, dass das verwendete Verfahren zur Analyse der ADAMTS-13-Aktivität den hohen Anteil der ADAMTS-13-Mängel unter gesunden Probanden verursacht. Die hier getesteten 80 Normalpersonen zeigten alle eine ADAMTS-13-Aktivität über 50%, was einerseits die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt und andererseits die Qualität der Methode belegt. Die Sensitivität und Spezifität der Methode wird zusätzlich durch die klinischen Daten (Kap. 4.2.) bewiesen.

Die Immunoblotting-Methode hat allerdings folgende Nachteile, die eine routinemäßige Anwendung im klinischen Alltag wesentlich behindern:

- Die Methode ist sehr arbeitsaufwendig und dauert 3-4 Tage. Die Anwendung der Immunoblotting-Methode ist daher im wesentlichen auf retrospektive Studien beschränkt und kann nicht zur schnellen Diagnose und für das Therapie-Monitoring herangezogen werden.
- Die Anzahl der Proben pro Test ist durch die Gelgröße sehr limitiert, es können bei 20 Spalten im Gel pro Test nur 14 Proben in Einzelbestimmung bzw. 7 Proben in Doppelbestimmung untersucht werden. Die Methode ist daher für Studien mit hohem Probendurchsatz nicht geeignet.
- Ohne die Ausrüstung für eine densitometrische Auswertung (Kosten ca. € 200.000) ist keine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität möglich.

Insbesondere der erstgenannte Punkt machte die Entwicklung einer neuen und schnellen Methode für die Anwendung im klinisch-diagnostischen Labor unabdingbar. Dies wurde

erreicht, indem das aufwendige Immunoblotting durch die automatisierte Messung der Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des Substrates (VWF:RCo) ersetzt wurde. Die erfolgreiche Anwendung des VWF:RCo-Testes in dem entwickelten Verfahren ist insofern überraschend, da dieser Test üblicherweise nur für die Bestimmung der VWF-Aktivität in einer gegebenen Plasmaprobe dient. In dem entwickelten Verfahren wird dagegen die Restaktivität eines zugesetzten VWF-Substrates in einem extrem unphysiologischem Reaktionsmedium (5 mM Tris-HCl; 1,5 M Harnstoff) gemessen.

Die Bestimmung der VWF:RCo ist der meist angewendete Test für die Bestimmung der funktionellen Aktivität des VWF [Turecek et al. 2002]. Der Test zeichnet sich allerdings durch eine vielerorts kritisierte hohe Variabilität aus [Favaloro 1999, Favaloro et al. 1999; Budde et al. 2002; Turecek et al. 2002;]. Für das hier verwendete kommerziell erhältliche „BC Von Willebrand Reagenz“ von Dade Behring (Marburg, Deutschland) dokumentiert der Hersteller Variationskoeffizienten von 6,1 bis 16,9% [Dade Behring 2001a]. Die Intra-Assay Variabilität beträgt für eine Probe mit normaler VWF-Aktivität 8,0 bis 9,6% und für eine Probe mit erniedrigter VWF-Aktivität 6,1 bis 16,2% [Dade Behring 2001a]. Angesichts dieser Beobachtungen ist die hier gefundene niedrige Variabilität der RCo-Messung eines hochgereinigten VWF-Substrates in einem sehr unphysiologischem Medium von 3,9% für die Probe mit normaler VWF-Aktivität und 7,5% für die Probe mit erniedrigter VWF-Aktivität erstaunlich. Es lässt sich vermuten, dass die sonst übliche hohe Variabilität des VWF:RCo-Testes im Plasma, nicht durch das Reagenz, sondern vielmehr durch die Instabilität des VWF-Moleküls im Plasma verursacht wird. Die niedrige Variabilität der RCo-Messung in dem gegebenen Reaktionsmedium ist die Voraussetzung für die Anwendung des Testes in dem entwickelten Verfahren, da sich ansonsten die hohe Variabilität des RCo-Testes und die natürliche Variabilität der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung addieren würden.

Neben einer niedrigen Variabilität bei der RCo-Messung, ist zudem eine zeitliche Stabilität der Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des Substrates zu fordern. Da die Reaktion *in vitro* sehr langsam verläuft (Kap. 1.4.1.), wird das Reaktionsgemisch 9-15 Stunden bei 37°C inkubiert. Die VWF:RCo muss demnach über viele Stunden bei 37°C stabil bleiben, um einen spezifischen Abbau des VWF-Substrates durch ADAMTS-13 detektieren zu können. Die in Abbildung 22 dargestellte Kinetik zeigt eine grundlegende Stabilität der VWF:RCo-Aktivität innerhalb der ersten 8 Stunden. In den darauffolgenden 24 Stunden wurde eine geringfügige, nicht-enzymatische Erniedrigung der VWF:RCo-Aktivität um 20% des Ausgangswertes beobachtet. Die kinetischen Analysen belegen, dass die Stabilität des Substrates unter den gegebenen Bedingungen für die quantitative Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ausreichend ist.

Die niedrigen Intra-Assay-Variationskoeffizienten von 2,8% und 8,7% für ein normales und pathologisches Kontrollplasma belegen die Reproduzierbarkeit der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung durch die RCo-Methode. Dementsprechend lag die Variabilität der Doppelbestimmungen in der Regel weit unter 10%. Die Inter-Assay Variabilität lag mit 8,6%

für das normale Kontrollplasma und 16,9% für das abnormale Kontrollplasma erwartungsgemäß höher als die Intra-Assay Variabilität.

Die Tabelle 16 zeigt die Variabilität des hier entwickelten Verfahrens im Vergleich zu den bisher publizierten Variabilitäten anderer Methoden.

Tabelle 16: Publierte Variabilitäten von verschiedenen Methoden zur ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung

n.d.= nicht dokumentiert

Methode:	Intra-Assay Variationskoeffizient:	Inter-Assay Variationskoeffizient:	Referenz:
ELISA mit monoklonalen Antikörpern (Kap. 1.5.5.) nach He et al.	3,6-4,5% n=4 für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität	8,5% n=4 für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität	He et al. 2001
Kollagenbindungstest nach Gerritsen et al. (Kap. 1.5.3.) mit kleinen Modifikationen	8,2% n=n.d. für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität	6,2% n=n.d. für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität	Loof et al. 2001
Kollagenbindungstest nach Gerritsen et al. (Kap. 1.5.3.) mit kleinen Modifikationen	8% n=18 ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Probe: n.d.	14% n=74 ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Probe: n.d.	Mannucci et al. 2001
RCo-Methode	2,8 % n=20 für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität 8,7 % n=20 für eine Probe mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität	8,6% n=14 für eine Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität 16,7% n=118 für eine Probe mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität	vorliegende Arbeit

Die Literaturrecherche zeigt, dass die Reproduzierbarkeit nur für wenige Methoden systematisch untersucht worden ist. In der Literatur wurden nur die in der Tabelle 16. verzeichneten Variabilitäten gefunden, wobei die Ergebnisse von He et al. [2001] aufgrund der geringen Anzahl der durchgeführten Teste nicht sehr aussagekräftig sind. Bei den anderen Studien fehlt die Angabe für die Anzahl der Bestimmungen [Loof et al. 2001] bzw. für die ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Probe [Mannucci et al. 2001]. Die Testanzahl wie auch die ADAMTS-13-Aktivität der getesteten Probe hat jedoch einen ganz entscheidenden Einfluss auf den Variabilitätskoeffizient. Die Reproduzierbarkeit der entwickelten RCo-Methode lässt sich aufgrund dieser dürftigen Datenlage nur sehr eingeschränkt bewerten. Die Daten zeigen allerdings, dass die Variabilität der RCo-Methode für die Probe mit normaler ADAMTS-13-Aktivität keinesfalls höher liegt als die Variabilität bei den anderen Methoden. Die Probe mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität weist erwartungsgemäß eine höhere

Variabilität auf. Der relativ hohe Inter-Assay Variationskoeffizient der pathologischen Probe belegt die Notwendigkeit einer weiteren Optimierung des Verfahrens.

Die sukzessive Verbesserung der RCo-Methode innerhalb der letzten beiden Jahre wurde bereits unter 3.1.2. ausführlich beschrieben und diskutiert. In der Zukunft sind weitere systematische Versuche geplant, bei welchen der Einfluss von Puffer-, Substrat-, BaCl₂-, Harnstoff und Plasma-Konzentration näher untersucht werden soll. Daneben sollen die Reaktionszeit, die Substratentfaltung und die RCo-Bestimmung optimiert werden. Dabei soll neben einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit insbesondere die Reaktionszeit und die Sensitivitätsgrenze erniedrigt werden. Darüber hinaus soll der Test auch für die Detektion erhöhter ADAMTS-13-Aktivitäten validiert werden.

Die erhöhte ADAMTS-13-Aktivität könnte prinzipiell eine bisher unentdeckte klinische Bedeutung haben, da eine gesteigerte VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13 theoretisch eine Blutungsneigung verursachen könnte. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht systematisch untersucht werden. Aus diesem Grund beschränkt sich die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse auf normale bzw. erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität, wobei vereinzelte Proben mit ADAMTS-13-Aktivität oberhalb der Norm der Einfachheit halber als normal (definiert als nicht erniedrigt) bezeichnet werden.

Wie oben bereits ausgeführt, entscheidet der Labor-interne Normalbereich wesentlich über die Qualität eines Testes bzw. über die klinische Bedeutung und Anwendbarkeit des Verfahrens. Zudem sollte die Sensitivitätsgrenze einer guten Methode möglichst gering sein, dies gilt insbesondere für den ADAMTS-13-Aktivitätstest, da für die Diagnose der TTP eine zuverlässige Differenzierung zwischen einem schwerem und mildem ADAMTS-13-Mangel notwendig ist (Kap. 4.3.).

Im folgenden werden die in der Literatur dokumentierten Normalbereiche und Sensitivitätsgrenzen für die verschiedenen Verfahren miteinander verglichen (Tab. 17).

Die Methode von Tsai präsentiert mit Abstand den engsten Normalbereich, die Kollagenbindungsmethode zeigt demgegenüber in 2 von 4 Arbeitsgruppen einen sehr weiten Normalbereich. Der Normalbereich von 52-136% der hier entwickelten RCo-Methode belegt wiederum die Qualität des Verfahrens, insbesondere im Vergleich zu den anderen, international gängigen Methoden. Der Vergleich für die Detektionsgrenzen zeigt, dass die elektrophoretischen Methoden die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivitäten in deutlich niedrigeren Bereichen zulassen. Hier besteht, wie oben bereits beschrieben, die Notwendigkeit einer weiteren Optimierung des entwickelten Verfahrens.

Für die in der Literatur weniger bedeutsamen Methoden der Dialyse-induzierten VWF-Proteolyse (Kap. 1.5.5.) und der ELISA-Technik nach He et al. (Kap. 1.5.6.) wurden keine exakt quantifizierten Normalbereiche und Sensitivitätsgrenzen erstellt [Aronson et al. 2001; Rick et al. 2002; Krizek und Rick 2001; He et al. 2001].

Tabelle 17: Normalbereiche und Sensitivitätsgrenzen von verschiedenen Methoden zur ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung

n.d.= nicht dokumentiert

Methoden:	Normalbereich:	Sensitivität:	Referenz:
Immunoblotting (Kap.1.5.1.)	>50%	1-3%	Furlan et al. 1998
	60-155%	3%	Mori et al. 2002
	>50%	6,25%	vorliegende Arbeit
SDS-Page (Kap.1.5.2.)	79-127%	2%	Tsai 2002
Kollagenbindung (Kap. 1.5.3.)	28-119%	6,25%	Gerritsen et al. 1999
	40-170%	6%	Mannucci et al. 2001
	60-140%	n.d.	Loof et al. 2001
	62-185%	2%	Schneppenheim et al. 2003b
Zweiseitiger ELISA (Kap. 1.5.4.)	49-200%	5%	Veyradier et al. 2001
RCo-Methode	52-136%	6,25%	vorliegende Arbeit

Die Detektionsgrenze wird wesentlich von dem Verdünnungsfaktor der Plasmaprobe bestimmt. Die optimale Verdünnung schließt zum einen eine Interferenz der endogenen VWF-Konzentration und anderer Plasmafaktoren aus und lässt zum anderen eine Detektion niedriger Enzymaktivitäten zu. Bei der Immunoblotting-, der SDS-PAGE- und der Kollagenbindungs-Methode beträgt das Verhältnis von Plasma zum Reaktionsmedium in der Regel 1:30 [Furlan et al. 1996; Tsai 1996; Gerritsen et al. 1999]. Bei dem zweiseitigen ELISA nach Obert et al. [1999] ergibt sich nach einer 1:10 Verdünnung des Plasmas mit dem Reaktionspuffer und der anschließenden Aktivierung und Substratzugabe ein Verhältnis von Plasma zu Reaktionsmedium von 1:18. Bei der entwickelten RCo-Methode beträgt das Verhältnis von Plasma zu Reaktionsmedium 1:30,5. Um eine mögliche Interferenz durch endogenen VWF auszuschließen, wurde gezeigt, dass die Proben, bei welchem das Substrat durch H₂O ersetzt wurde, keine messbare VWF:RCo (<2,5%) aufweisen. Zudem zeigten Proben mit ungewöhnlich hoher endogener VWF:RCo (>350%) von VWS-Patienten nach Gabe eines VWF-Konzentrates (Haemate-HS, Aventis) durchweg normale ADAMTS-13-Aktivitäten. Es wurde daher postuliert, dass die endogene VWF-Konzentration die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mittels der RCo-Methode nicht wesentlich beeinflusst. Dies sollte jedoch planmäßig untersucht werden, indem Plasmaproben mit unterschiedlichen Mengen von gereinigtem, proteasefreiem VWF versetzt werden, um nachzuprüfen ob die sukzessive Erhöhung der endogenen VWF-Konzentration das ADAMTS-13 Testergebnis beeinflusst.

Die RCo-Methode wurde durch extensiven Vergleich mit der Immunoblotting-Methode validiert. Dazu wurden zwischen Juli 2001 und Januar 2002 282 Plasmaproben von Patienten und gesunden Personen mittels beider Methoden analysiert. Die hohe Übereinstimmung von 94% beweist die Richtigkeit des entwickelten Verfahrens. Daraufhin wurden für die routinemäßige Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ab Januar 2002 das Immunoblotting-Verfahren nicht mehr durchgeführt.

Der bedeutungsvollste Beweis für die Richtigkeit und Genauigkeit des entwickelten RCo-Verfahrens lieferte jedoch die erfolgreiche Teilnahme an der ersten Multicenterstudie zum Vergleich der international gängigen Methoden zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität. Dabei wurden folgende Methoden miteinander verglichen:

- SDS-AGE (Kap. 1.5.1.) im Labor von Prof. Lämmle
- Kollagenbindungstest (Kap. 1.5.3.) im den Labors von Prof. Budde und Dr. Varadi
- Zweiseitiger ELISA (Kap. 1.5.4.) im Labor von Prof. Girma
- hier entwickelte RCo-Methode

Die SDS-PAGE-Methode (Kap. 1.5.2.) konnte leider nicht mit untersucht werden, da Prof. Tsai trotz Einladung nicht an der Studie teilgenommen hat und die Methode nur in seinem Labor durchgeführt wird. In der Studie wurden 30 maskierte Proben von Patienten mit congenitaler oder erworbener TTP und von Patienten mit anderen hämatologischen Erkrankungen (Tab. 7) an die teilnehmenden Labors zur Analyse der ADAMTS-13-Aktivität geschickt. Für Proben mit schwerem ADAMTS-13-Mangel wurde zusätzlich der Inhibitor gegen ADAMTS-13 untersucht.

Die Resultate der RCo-Methode zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunoblotting-Methode ($r=0,97$; Spearman-Rang Korrelation) wie auch mit den Ergebnissen des Kollagenbindungstestes ($r=0,90-0,94$; Spearman-Rang Korrelation) und dem zweiseitigem ELISA ($r=0,94$; Spearman-Rang Korrelation). Insgesamt zeigte die Studie eine gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Methoden mit Korrelationskoeffizienten $r \geq 0,89$. Bezüglich der Identifikation eines schweren ADAMTS-13-Mangels ergaben sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen des RCo-Testes, bei Anwendung des Kollagenbindungstestes allerdings ein falsch negatives und zwei falsch positive Resultate. Der Kollagenbindungstest ist eventuell störanfällig und sollte gegebenenfalls optimiert werden. Die Anwendung der RCo-Methode erlaubte zudem die korrekte Identifikation von Inhibitoren gegen ADAMTS-13. Die Ergebnisse der Multicenterstudie zeigen deutlich, dass das hier entwickelte RCo-Verfahren die ADAMTS-13-Aktivität zuverlässig quantifiziert. Die Ergebnisse der Multicenterstudie wurden auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt [Studt et al. 2003b+c] und wurden im September 2003 im Journal of Thrombosis and Haemostasis publiziert [Studt et al. 2003a].

Das entwickelte Verfahren bietet gegenüber den herkömmlichen Verfahren folgende Vorteile:

1. Die RCo-Methode ist einfach durchzuführen und beansprucht keine spezielle Laborausstattung, technisches Know-How oder nicht kommerziell erhältliche Reagenzien. Die Methode steht damit grundsätzlich jedem klinischem Routine-Gerinnungslabor zur Verfügung und ermöglicht so eine flächendeckende Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität. Die herkömmlichen elektrophoretischen Verfahren (Kap. 1.5.1.-1.5.2.) sind demgegenüber nur in spezialisierten Forschungslabors anwendbar, da die Durchführung eine spezielle

Laborausüstung und die notwendige Expertise benötigt. Die 1999 beschriebenen ELISA-Techniken (Kollagenbindungstest nach Gerritsen et al. [1999] und der zweiseitige ELISA nach Obert et al. [1999], Kap. 1.5.3.-1.5.4.) vereinfachen die ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung, können jedoch ebenfalls nur in Labors durchgeführt werden, welche über die ELISA-spezifische Ausrüstung und das entsprechende Know-How verfügen. Bei dem zweiseitigen ELISA werden zudem die spezifischen, monoklonalen Antikörper benötigt, welche nur wenigen Labors zur Verfügung stehen, da sie nicht kommerziell erhältlich sind. Alle weiteren Methoden (Kap. 1.5.5.-1.5.7.) lassen entweder zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine exakte Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität zu (Dialyse-induzierte VWF-Proteolyse, Kap. 1.5.5.) oder wurden (noch) nicht in der klinischen Anwendung validiert (Elisa nach He et al. [2001] und die Anwendung rekombinanter und chromogener Substrate, Kap. 1.5.6.-1.5.7.).

2. Der Zeitaufwand für die RCo-Methode beträgt mit einer Inkubationszeit von 9 Stunden insgesamt 11 Stunden. Damit ist die RCo-Methode schneller als die SDS-AGE (3-4 Tage) und der zweiseitige ELISA nach Obert et al. [1999] (3 Tage) und langsamer als der Kollagenbindungstest (6 Stunden) und die SDS-PAGE (2-4 Stunden). Da die SDS-PAGE aufgrund des experimentellen Aufwandes (Kap. 1.5.2.) nicht routinefähig ist, bleiben der Kollagenbindungstest die einzige Alternative für das Routine-Gerinnungslabor. Der Kollagenbindungstest ist jedoch möglicherweise störanfällig [Studt et al. 2003a] und hat in 2 von 4 Labors einen sehr weiten Normalbereich (Tab. 17). Nichtsdestotrotz bleibt der Kollagenbindungstest und die hier entwickelte RCo-Methode die einzigen Methoden, die im klinisch-diagnostischen Routinelabor anwendbar sind und eine zeitnahe Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ermöglichen. Nicht dargestellte Vorversuche zur Verkürzung der Inkubationszeit für das entwickelte Verfahren zeigen, dass die Reaktionszeit bei gleichbleibenden Resultaten auf mindestens 7 Stunden verkürzt werden kann. Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität kann eine frühzeitige Diagnose der TTP ermöglichen. Eine frühzeitige Diagnose und damit eine schnelle Einleitung der Plasmapherese-Therapie determiniert im wesentlichen den klinischen Verlauf einer akuten TTP-Episode [Chemnitz et al. 2001b]. Die zeitnahe Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ist auch aufgrund der neuesten Therapieoptionen (Kap. 1.3.3.) unerlässlich. Der schnelle Nachweis eines Inhibitors bzw. die Bestimmung des Inhibitortiters ist für die Entscheidung über alternative Therapieoptionen (Rituximab, Immunadsorption) essentiell. Eine zeitnahe und routinefähige ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung ist darüber hinaus die Voraussetzung für den Einsatz des potentiell verfügbaren, rekombinanten ADAMTS-13 Proteines.

3. Die RCo-Methode lässt sich mit einem minimalen Arbeitsaufwand von 2 Stunden durchführen und ist damit weitaus weniger arbeitszeitaufwendig als alle anderen Methoden. Dies ermöglicht eine Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität mit hohem Probendurchsatz bei geringem Aufwand für Arbeitskraftkosten.

Neben den überzeugenden Vorteilen besitzt die RCo-Methode gegenüber den herkömmlichen Verfahren allerdings auch Nachteile, die im Folgenden dargestellt werden:

1. Die RCo-Methode weist in der gegenwärtigen Form eine hohe Sensitivitätsgrenze von 6,25% auf. Ergebnisse von Barbot et al. [2001] und Furlan und Lämmle [2001] zeigen, dass sehr niedrige Enzymaktivitäten von 2-5% bei der Behandlung der hereditären TTP ausreichen können, um den Ausbruch einer akuten Episode zu verhindern. Die sensitive Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität unter 10% hat demnach eine wichtige, klinische Bedeutung und zukünftige Tests sollten aus diesem Grunde eine möglichst niedrige Sensitivitätsgrenze aufweisen.

2. Die Anwendbarkeit und Vorteile der RCo-Methode beruhen auf der Verwendung eines kommerziell erhältlichen Reagenzes (BC Von Willebrand Reagenz von Dade Behring, Deutschland, Marburg). Die Kosten für dieses Reagenz bestimmen die Kosten für die ADAMTS-13-Aktivitätsmessung. Die Materialkosten des RCo-Testes betragen pro Bestimmung 7,50 Euro und sind damit 6fach höher als die Materialkosten des Immunoblotting-Testes (1,25 Euro pro Bestimmung).

Während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengeschrieben worden sind, wurde eine Arbeit von Yoo et al. [2003] veröffentlicht, in dem eine neuartige Methode zur ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung vorgestellt wird, die sich ebenfalls der RCo-Messung bedient. Dabei wird in folgender Weise vorgegangen: Die Plasmaproben werden zunächst für 4 min bei 56°C inkubiert, um Fibrinogen und endogenen VWF zu präzipitieren. Die Proben werden anschließend verdünnt, mit VWF-Substrat versetzt und durch Zugabe von CaCl_2 zu einer Endkonzentration von 16,5 mM aktiviert. Nach einer kurzen Inkubation von 20-40 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt. Die verbleibende VWF:RCo wird mittels des BC Von Willebrand Reagenzes von Dade Behring (Marburg, Deutschland) ermittelt. Die Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität erfolgt durch Vergleich der mit CaCl_2 -aktivierten Proben mit den „gehemmten“ Proben gleicher Herkunft, bei welchen CaCl_2 durch EDTA ersetzt wurde. Die wichtigsten Unterschiede zu der hier entwickelten RCo-Methode sind demnach folgende:

- Die Testproben enthalten kein Fibrinogen. Dies ermöglicht den Zusatz einer hohen CaCl_2 -Menge ohne dass Fibrin gebildet wird.
- Die Aktivierung von ADAMTS-13 erfolgt durch Zugabe von CaCl_2 zu einer Endkonzentration von 16,5 mmol/l im Vergleich zu einer Aktivierung durch 8,3 mM BaCl_2 in dem hier entwickelten Verfahren.
- Die Inkubationszeit beträgt 20 bis 40 Minuten, während das hier entwickelte Verfahren eine lange Inkubationszeit von mindestens 7 Stunden benötigt, um die ADAMTS-13-Aktivität zuverlässig zu quantifizieren.

Insbesondere die Kinetik der VWF-Proteolyse in dem von Yoo et al. [2003] beschriebenen Verfahren zeigt, dass diese Methode grundlegend anders funktioniert als die hier entwickelte RCo-Methode. Die schnelle Proteolyse des Von Willebrand Faktors durch Zugabe von CaCl_2 ist erstaunlich, da auch die anderen Verfahren (Kap. 1.5.) längere Inkubationszeiten benötigen, um eine ADAMTS-13 katalysierte Proteolyse zu detektieren. Zudem funktioniert

das Verfahren anscheinend ohne eine chemische Entfaltung des VWF-Substrates durch Harnstoff oder Guanidiumhydrochlorid, welche bei allen der bislang publizierten Verfahren notwendig ist (Kap. 1.5.). Diese offensichtlichen Diskrepanzen zu den herkömmlichen Methoden werden in der entsprechenden Publikation nicht diskutiert. Die von Yoo et al. [2003] beschriebene Methode wurde nicht durch extensiven Vergleich zu einer der herkömmlichen Methoden validiert. Yoo et al. [2003] testeten lediglich eine einzige Probe mittels der SDS-Page-Methode nach Tsai [1996] (Kap. 1.5.2.) und dem von ihnen entwickelten Verfahren. Zudem fehlt eine breite klinische Anwendung, es wurden lediglich 2 Proben von Patienten mit TTP analysiert. Zusammenfassend bleibt die Methode von Yoo et al. [2003] aufgrund der kurzen Inkubationszeit eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Methoden, einschließlich des hier entwickelten Verfahrens. Es sollte jedoch zunächst nachgewiesen werden, ob der von Yoo et al. [2003] detektierte Verlust von VWF:RCo tatsächlich auf eine ADAMTS-13 katalysierte Proteolyse des VWF-Substrates zurückzuführen ist. Zudem sollte die Methode durch extensiven Vergleich mit einer herkömmlichen Methode validiert werden und die klinische Anwendbarkeit gezeigt werden.

An dieser Stelle sei noch einmal daraufhingewiesen, dass die gegenwärtigen Methoden, einschließlich der hier entwickelten RCo-Methode, angesichts der Ergebnisse von Dong et al (Kap. 1.4.1) die tatsächliche in vivo Aktivität von ADAMTS-13 nur sehr unzureichend messen. In Zukunft sollten demnach Verfahren entwickelt werden, welche die in-vivo Verhältnisse besser nachahmen als die statischen Bedingungen der bisherigen Methoden. Amar et al. [2002] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dong dokumentierte bereits erste Vergleiche zwischen der SDS-AGE-Methode und dem von ihnen entwickelten Test auf der Endothelzelloberfläche (Kap. 1.5.7.). Die Resultate zeigen, dass der Test auf der Endothelzelloberfläche ADAMTS-13-Aktivitäten detektiert, während die statische SDS-AGE Methode in den gleichen Proben keine ADAMTS-13-Aktivität nachweisen kann. Die statische in-fluid gemessene in vitro Aktivität von ADAMTS-13 hat sich in den letzten Jahren allerdings als sehr bedeutsam erwiesen, da sie nicht nur zur Entdeckung von ADAMTS-13 und zur Aufklärung der TTP-Pathogenese geführt hat (Kap. 1.3.-1.4.), sondern darüber hinaus eine brisante klinische Relevanz (Kap. 4.2.) erlangt hat. Die routinefähige Anwendung der so gemessenen ADAMTS-13-Aktivität ist demnach nicht nur gerechtfertigt, sondern unbedingt erforderlich, wenigstens bis zu dem Zeitpunkt, in dem diese Verfahren durch bessere und physiologischere Methoden ersetzt werden können.

Zusammenfassend beweisen die in den Kapiteln 3.1.-3.2. dargestellten Ergebnisse die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit des entwickelten Verfahrens. Der wesentliche Vorteil des entwickelten Verfahrens gegenüber den herkömmlichen Verfahren liegt in der Anwendbarkeit im klinisch-diagnostischen Gerinnungslabor. Der Test könnte demnach eine sehr weitreichende, klinische Bedeutung erlangen.

Das neuartige Verfahren und die wichtigsten Daten zur Validierung und klinischen Anwendung wurden bereits im August 2002 in *Annals of Hematology* publiziert [Böhm et al. 2002c]. Darüber hinaus wurde das Verfahren sowohl auf nationalen [Böhm et al. 2002d] als

auch internationalen Kongressen [Böhm et al. 2001 und in einem Vortrag auf dem Annual Meeting 2002 of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis in Boston, USA] präsentiert und damit einem breitem wissenschaftlichem Publikum vorgestellt.

4.2. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit TTP

4.2.1. Sensitivität und Spezifität des schweren ADAMTS-13-Mangels für die TTP

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwischen April 2001 und Oktober 2003 die ADAMTS-13-Aktivität in 815 Plasmaproben von 29 Patienten mit TTP untersucht. 28 Proben von 20 Patienten stammen aus der akuten Phase vor Beginn der PP-Therapie. 25 dieser 28 Proben zeigten einen hochgradigen ADAMTS-13-Mangel (<6,25%). In dem hier untersuchten Patientenkollektiv beträgt die Sensitivität der hochgradig erniedrigten ADAMTS-13-Aktivität für die TTP demnach 89%. In der Literatur schwankt die Sensitivität des schweren ADAMTS-13-Mangels für die akute TTP zwischen 30 und 100% (Tab. 18).

Tabelle 18: Publierte Studien über Sensitivität des hochgradigen ADAMTS-13-Mangels für die akute TTP

Referenz:	Sensitivität des hochgradigen ADAMTS-13-Mangels für die akute TTP	Anzahl der untersuchten Proben
Tsai 2003a	100%	127
Tsai und Lian 1998	100%	39
Loof et al. 2001	100%	4
Hulstein et al. 2003	97%	36
Remuzzi et al. 2002	92%	12
Furlan et al. 1998	86%	30
Veyradier et al. 2001	71%	66
Mori et al. 2002	67%	18
Studt et al. 2003d	63%	72
Fujimura 2003	52%	108
Vesely et al. 2003*	33%*	48*
Moore et al. 2001	30%	20
Vorliegende Arbeit	89%	28

*In der Studie von Vesely et al. [2003] handelt es sich um ein Patientenkollektiv mit der Diagnose TTP-HUS, d.h. es erfolgte keine Differenzierung zwischen TTP und HUS.

Die ADAMTS-13-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit bei 328 weiteren Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und 107 gesunden Probanden untersucht (Kap 2.3.-2.4.). Dabei findet sich bei keinem Patienten ohne TTP und bei keinem gesunden Probanden eine ADAMTS-13-Aktivität <12,5%. Es ergibt sich im Vergleich zu den untersuchten Kollektiven

eine Spezifität der hochgradig erniedrigten ADAMTS-13-Aktivität für die akute TTP von 100%. In den bislang publizierten Studien wurde eine Spezifität des schweren ADAMTS-13-Mangels für die TTP zwischen 44 und 100% gefunden (Tab. 19).

Tabelle 19: Publierte Studien über Spezifität des hochgradigen ADAMTS-13-Mangels für die akute TTP

Referenz:	Spezifität des hochgradigen ADAMTS-13-Mangels für die akute TTP	Anzahl der untersuchten Proben TTP/Andere	Andere untersuchte Erkrankungen
Tsai und Lian 1998	100%	39/39	Verschiedene
Furlan et al. 1998	100%	30/23	HUS
Loof et al. 2001	100%	4/24	ITP, DIC
Mori et al. 2002	100%	18/9	HUS
Studt et al. 2003d	100%	72/111	HUS
Hulstein et al. 2003	100%	36/44	u.a. KMT ass. TMA, HUS
Fujimura 2003	100%	108/44	HUS
Veyradier et al. 2001	96%	66/45	HUS
Moore et al. 2001	85%	20/40	SLE, ITP, DIC
Remuzzi et al. 2002	44%	12/9	HUS
Vorliegende Arbeit	100%	28/328	Siehe Kap. 3.3.-3.5.

Die Literaturrecherche zeigt zusammenfassend, dass 8 von 10 Studien eine Sensitivität >62% und 6/8 Studien eine Spezifität >95% fanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Sensitivität=93%; Spezifität=100%) bestätigen damit den Großteil der bislang veröffentlichten Studien und unterstreichen den, in den Kapiteln 1.3.-1.4. dargestellten, engen Zusammenhang zwischen ADAMTS-13 und TTP.

Insbesondere die Studien von Moore et al. [2001], Remuzzi et al. [2002] und die im Kapitel 1.4.4. aufgeführten Studien über erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten ohne TTP haben eine heftige Debatte über die Sensitivität und Spezifität des ADAMTS-13-Mangels für die TTP ausgelöst [Furlan 2003; George und Vesely 2003; Lämmle et al. 2003; Tsai 2003c+d, Remuzzi 2003a+b].

Tsai [2003c] postulierte, dass TTP immer durch einen ADAMTS-13-Mangel verursacht wird. Die dadurch ausgelöste unzureichende VWF-Protolyse führt zu einer Anreicherung der hochmolekularen, hyperaktiven VWF-Multimere, welche Mikrothrombosen an Orten mit hohen Scherkräften hervorrufen (Kap. 1.4.3.). Dementsprechend fand Tsai in seinen Studien stets eine Sensitivität und Spezifität des ADAMTS-13-Mangels für die TTP von 100% (Tab. 18 und 19). Die Arbeitsgruppe um Lämmle dokumentierte eine Sensitivität von 63-86% und eine 100%ige Spezifität des schweren ADAMTS-13-Mangel für die TTP (Tab. 18 und 19) [Furlan et al. 1998, Studt et al. 2003d]. Lämmle et al. [2003] folgern, dass der ADAMTS-13-Mangel tatsächlich sehr spezifisch, aber weniger sensitiv für die TTP ist. Die Studien von

Veyradier et al. [2001] und Mori et al. [2002] fanden ebenfalls Patienten mit TTP und normaler oder nur moderat erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität. Dies entspricht auch unseren Ergebnissen, da 2 von 29 TTP-Patienten eine deutlich messbare ADAMTS-13-Aktivität von 23 bzw. 49% aufwiesen.

Moore et al. [2001] beschrieben einen schweren ADAMTS-13-Mangel bei nur 6 von 20 Patienten mit TTP und damit eine außergewöhnlich niedrige Sensitivität von 30% (Tab. 18). Die Studie weist jedoch einige methodische Schwächen auf, welche die Richtigkeit der dargestellten Befunde in Frage stellen. Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität erfolgte dort semiquantitativ mit der Immunoblotting-Methode (Kap. 1.5.1.). Die Quantifizierung erfolgte jedoch nicht wie üblicherweise anhand einer mitgeführten Eichgerade, sondern durch visuellen Vergleich des Substrates ohne Zugabe von Plasma. Zudem wurde der Test mit einer ungewöhnlich niedrigen Plasmaverdünnung von 1:4,5 (statt 1:30 bei Furlan et al. 1998) durchgeführt. Darüber hinaus detektieren die Autoren einen absonderlich hohen Anteil schwerer ADAMTS-13-Mängel bei Patienten mit ITP (5%), DIC (39%) und SLE (20%), was in den Studien von Loof et al. [2001], Bianchi et al. [2002a] und in unseren Ergebnissen (Kap. 4.3.) nicht belegt werden konnte. Zusammenfassend sollten die Befunde aus der Studie von Moore et al. [2001] kritisch bewertet werden.

Remuzzi et al. [2002] fanden einen auffallend hohen Anteil schwerer ADAMTS-13-Mängel bei Patienten mit D-HUS (56%). Remuzzi [2003a+b] argumentierte, dass TTP bzw. HUS in erster Linie eine klinische Diagnose darstellt und aus diesem Grund nicht vom Ergebnis eines einzelnen Laborbefundes (ADAMTS-13-Aktivität) determiniert werden sollte.

Tsai [2003b] machte die unterschiedliche Methodik (Kap. 1.5.) zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität für die diskrepanten Ergebnisse bei den verschiedenen Studien verantwortlich. Die unter Kapitel 4.1. diskutierte Multicenterstudie belegt jedoch, dass sich die diskrepanten Ergebnisse bei der dort gefundene niedrigen Inter-Assay Variabilität kaum durch die unterschiedlichen Methoden erklären lassen.

Die Diskrepanz der verschiedenen Studien (Tab. 18 und 19) lässt sich am ehesten durch die unterschiedlichen diagnostischen Kriterien der behandelnden Kliniker begründen. Die klinische Differenzierung zwischen TTP und HUS kann insbesondere schwierig sein. Patienten mit dominanter renaler Symptomatik werden in der Regel mit HUS und Patienten mit dominanten neurologischen Symptomen mit TTP diagnostiziert (Kap. 1.3.1.). Die Syndrome sind jedoch gelegentlich klinisch schwer voneinander abzugrenzen, da Patienten mit HUS ebenfalls neurologische Symptome aufweisen und Patienten mit TTP gelegentlich eine Niereninsuffizienz entwickeln und nicht immer neurologische Symptome aufweisen [George 2000; Hosler et al. 2003; Tsai 2003b].

Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurde bei Patienten mit TTP nur sehr vereinzelt eine renale Symptomatik beobachtet. Es kam bei keinem der Patienten zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz, zudem traten die renalen Symptome bei den

betreffenden Patienten erst im weiteren Verlauf ihrer TTP-Manifestation auf. Die Patientin C.E. (Abb. 32 I) entwickelte z.B. einige Tage nach den typischen neurologischen Symptomen eine Niereninsuffizienz mit einem Anstieg des Serum Kreatinins auf 5,0 mg/dl (Norm: 0,52 - 0,9 mg/dl). Demgegenüber erlitt ein Patient mit einem typischen E.coli 0157-positivem HUS nach dem Auftreten einer Niereninsuffizienz neurologische Symptome (amnestische Aphasie). und verstarb schließlich an schweren intracerebralen Massenblutungen.

George [2000] und Vesely et al. [2003] haben vorgeschlagen, eine klinische Differenzierung zwischen TTP und HUS zu unterlassen, da beide Syndrome, ihrer Meinung nach, gleichermaßen mit Plasma behandelt werden. Wie im Kapitel 1.3. aufgeführt handelt es sich, in Anbetracht der auslösenden Faktoren, bei TTP und HUS sehr wohl um unterschiedliche Krankheitsentitäten. Hosler et al. [2003] beschrieben in einer Studie von 56 TMA-Patienten, dass sich die Thromben bei Patienten mit TTP morphologisch durch ihren hohen Gehalt an Thrombozyten eindeutig von den Thromben bei Patienten mit HUS differenzieren lassen. Die Autoren belegten damit das Vorliegen einer grundsätzlich anderen Pathophysiologie bei TTP im Vergleich zum HUS.

In der Studien von Tsai (Tab 4.3.) wurden alle Patienten mit einer sekundären thrombotischen Mikroangiopathie, welche z.B. durch Schwangerschaft, Medikamente, Transplantation, maligne oder vaskuläre Erkrankungen ausgelöst werden könnten, ausgeschlossen [Tsai 2003c]. Des weiteren wurden Patienten mit Diarrhoe, Patienten mit Verdacht auf HUS und Kinder unter 10 Jahren ausgeschlossen [Tsai 2003c]. Nach Tsai werden bei Anwendung dieser stringenten diagnostischen Kriterien all diejenigen Patienten erfasst, die an einer idiopathischen TTP leiden, welche durch einen ADAMTS-13-Mangel verursacht wird. In der Studie von Vesely et al. [2003] wurden demgegenüber alle Patienten mit einer Thrombozytopenie und einer mikroangiopathischen Anämie mit einem TTP-HUS Syndrom diagnostiziert. Die Autoren fanden dementsprechend nur eine Sensitivität des ADAMTS-13-Mangels für TTP-HUS von 33% (Tab. 18). Tsai [2003a] forderte eine revidierte Klassifizierung der thrombotischen Mikroangiopathien, bei welcher klar zwischen den verschiedenen kausalen und pathophysiologisch relevanten Faktoren unterschieden wird (Abb. 48).

TTP wäre demnach definiert als eine thrombotische Mikroangiopathie, welche durch einen Mangel an ADAMTS-13 ausgelöst wird. Dies erfordert allerdings eine umgehende Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität. Die derzeitige Methodik erlaubt allerdings, wie unter Kapitel 4.1. bereits diskutiert, zur Zeit keine schnelle und flächendeckende Messung der ADAMTS-13-Aktivität. In der weltweit gängigen klinischen Praxis erfolgt die Diagnose einer TTP bzw. eines HUS durch Nachweis einer thrombotischen Mikroangiopathie und der typischen klinischen Symptome (Kap. 1.3.).

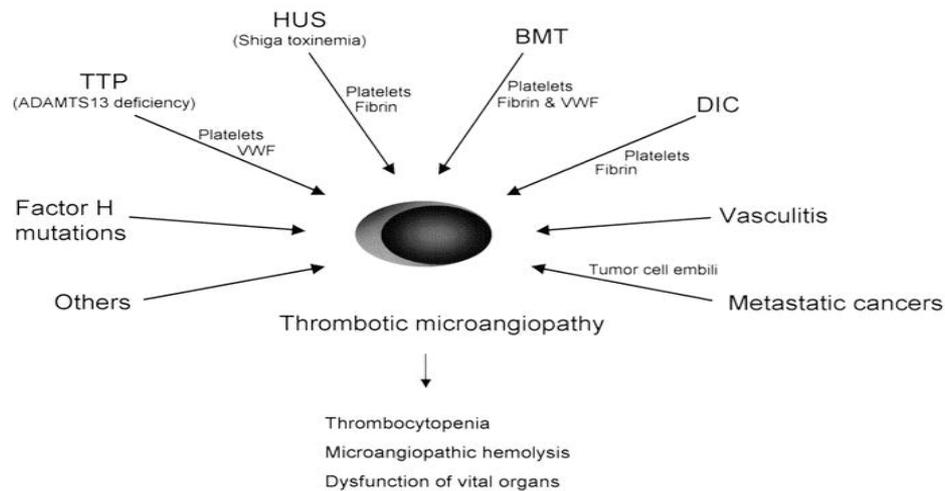


Abbildung 48: Klassifizierung der thrombotischen Mikroangiopathien nach Tsai

[Tsai 2003a]

BMT: **b**one **m**arrow **t**ransplantation (Knochenmarkstransplantation)

DIC: **d**isseminated **i**ntravascular **c**oagulation (Verbrauchskoagulopathie)

Allerdings finden sich auch bei Anwendung der von Tsai vorgeschlagenen, diagnostischen Kriterien in dem hier untersuchten Patientenkollektiv 2 Patienten mit einer sogenannten idiopathischen TTP bei fehlendem, schwerem ADAMTS-13-Mangel. Die diskrepanten Befunde aus der Literatur lassen sich demnach nicht ausschließlich auf die unterschiedlichen diagnostischen Kriterien zurückführen.

Es ist weitgehend akzeptiert, dass Patienten mit HUS ein sehr viel schlechteres Ansprechen auf Plasmatherapie als Patienten mit TTP zeigen [Moake 2002a]. In diesem Zusammenhang wurde die Effizienz der Plasmatherapie bei einer thrombotischen Mikroangiopathie (TMA) mit nachweislich normaler ADAMTS-13-Aktivität in den letzten Jahren in der Literatur angezweifelt. Einige Arbeitsgruppen beobachteten ein schlechteres Ansprechen auf Plasmatherapie bei TMA-Patienten ohne hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität im Vergleich zu Patienten mit schwerem ADAMTS-13-Mangel [Mori et al. 2002; Hosler et al. 2003]. In der Studie von Vesely et al. [2003] ergibt sich dagegen kein statistisch messbarer Unterschied in der therapeutischen Wirksamkeit der Plasmatherapie bei TMA-Patienten mit und ohne messbare ADAMTS-13-Aktivität. Allerdings verstarben bei der Studie von Vesely et al. [2003] in der Gruppe mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität 68 von 124 Patienten (55%), während in der Gruppe mit hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität lediglich 3 von 18 Patienten (17%) verstarben.

Kategorisiert man das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv in TMA mit und ohne ADAMTS-13-Aktivität, so ergibt sich bei den Patienten mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität eine Mortalität von 43% im Vergleich zu 5% bei den Patienten ohne messbare ADAMTS-13-Aktivität (Tabelle 20).

Tabelle 20: Mortalität bei TMA-Patienten mit und ohne detektierbare ADAMTS-13-Aktivität

Ein Patient mit TTP zeigte während seiner Erstmanifestation einen hochgradigen ADAMTS-13-Mangel und in seinen 2 Rezidiven ein Aktivität von 23%. Dieser Patient wurde demzufolge in beide Gruppen aufgenommen.

KMT: Knochenmarkstransplantation

TMA: thrombotische Mikroangiopathie

	Anzahl	Diagnose	Alter [Jahre] MW+/-SD (Bereich)	Geschlecht m/w	Mortalität
TMA mit ADAMTS-13-Aktivität <6,25%	19	TTP (n=19)	41+/-13 (19-67)	7/12	1/19 (5%)
TMA mit ADAMTS-13-Aktivität >12,5%	7	TTP (n=2) HUS (n=3) KMT ass.TMA (n=2)	29+/-15 (13-58)	4/3	3/7 (43%)

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv ergibt sich, trotz der geringen Fallanzahl, ein klarer Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem Ansprechen auf Plasmatherapie. Es ist bemerkenswert, dass die beiden Patienten mit TTP und einer messbaren ADAMTS-13-Aktivität eine ausgesprochen gutes Ansprechen auf Plasmapherese-Therapie zeigten, während ein Patient mit einer KMT-assoziierten TMA und zwei Patienten mit HUS trotz intensiver PP-Therapie verstarben.

Diese Beobachtungen sind aufschlussreich, trotzdem ergeben sich zur Zeit keine eindeutigen, therapeutischen Konsequenzen. Die meisten Wissenschaftler sind sich einig, dass Patienten mit TMA und messbarer ADAMTS-13-Aktivität in jedem Fall mit Plasma behandelt werden sollten [George und Vesely 2003; Vesely et al. 2003; Lämmle et al. 2003]. Dies ist evident, weil Plasmapherese trotz unentdecktem Wirkungsmechanismus bei vielen TMA-Patienten sehr effizient ist. Zudem ist Plasmapherese bei HUS und anderen thrombotischen Mikroangiopathien immer noch die Therapie der Wahl, da im Prinzip keine alternativen Therapiekonzepte zur Verfügung stehen. Nichtsdestotrotz sollten bei TMA-Patienten mit fehlendem ADAMTS-13-Mangel eingehendere Untersuchungen erfolgen, um gegebenenfalls andere Ursachen der TMA (z.B. maligne, infektiöse oder vaskuläre Erkrankungen) auszuschließen oder andernfalls eine mehr ursächliche Therapie einzuleiten.

In diesem Zusammenhang belegen einige Fallstudien den klinisch-diagnostischen Wert der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung. Forman et al. [2003] berichteten beispielsweise über eine Patientin mit deutlichen Anzeichen einer thrombotischen Mikroangiopathie bei normaler ADAMTS-13-Aktivität. Bei dieser Patientin wurde die TMA durch ein metastasierendes Karzinom ausgelöst. Die Patientin zeigte kein Ansprechen auf Plasmapherese-Therapie und verstarb 26 Tage nach den ersten Anzeichen ihrer TMA. Das Vorliegen von normaler ADAMTS-13-Aktivität bei akuter TMA kann in solchen Fällen auf andere auslösende Faktoren hinweisen, welche unter Umständen andere, mehr ursächliche Therapien nach sich ziehen würden. Tsai und Shulman [2003] berichteten hingegen über eine Patientin mit

rezidivierenden ischämischen Attacken (TIA) ohne einer begleitende Thrombozytopenie oder einer hämolytischen Anämie. Bei der Patientin wurde ein hochgradiger ADAMTS-13-Mangel bei inhibierenden Antikörpern gegen ADAMTS-13 festgestellt. Die Patientin wurde daraufhin mit Rituximab behandelt, wodurch der Inhibitor gegen ADAMTS-13 eliminiert und ihre ADAMTS-13-Aktivität rekonstituiert wurde. Die Patientin hat seitdem keine transient ischämischen Attacken mehr erlitten.

Schneppenheim et al. [2003b] fanden unter 11 Kindern mit nachweislich congenitaler TTP drei Kinder, welche irrtümlicherweise mit einem Evans-Syndrom (n=1) und einer ITP (n=2) diagnostiziert wurden.

In unserem Labor wurde ebenfalls ein Patient mit einer vermutlich congenitalen TTP gefunden, welcher irrtümlicherweise mit D+HUS diagnostiziert wurde. Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität im Rezidiv-freien Intervall zeigte bei diesem Patienten einen schweren ADAMTS-13-Mangel ohne detektierbaren Inhibitor. Die Familienuntersuchung des Patienten offenbarte eine hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität bei der Schwester des Patienten und grenzwertig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität (58-62%) bei beiden Elternteilen. Die Schwester des Patienten wurde vor mehreren Jahren nach einem ischämischen Schlaganfall und rezidivierender Thrombopenie splenektomiert. Sollte sich die Verdachtsdiagnose der congenitalen TTP bei diesen Patienten bestätigen (Ergebnisse der ADAMTS-13-Mutationsanalyse stehen zur Zeit noch aus), hat diese Diagnose eine ganz erhebliche therapeutische Konsequenz für die Patienten, da eine congenitale TTP durch regelmäßige Plasmainfusion sehr effizient behandelt werden kann [Allford et al. 2000; Barbot et al. 2001; Loo et al. 2000; Biecker et al. 2001, Häberle et al. 1999]. Die Patienten benötigen keine Plasmapherese und sollten keinesfalls splenektomiert werden. Dieses Beispiele zeigen deutlich, dass die klinischen Symptome einer thrombotischen Mikroangiopathie sehr variabel sein können und das Resultat der ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung eine entscheidende klinische und therapeutische Bedeutung innehat.

Theoretisch könnte eine TMA trotz messbarer ADAMTS-13-Aktivität ebenfalls durch eine mangelnde VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13 ausgelöst werden. Die Patienten könnten eine erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität in vivo aufweisen, welche durch die derzeitigen in vitro Teste nicht detektiert wird (Kap. 1.5. und Kap. 4.1.). Die Patienten könnten z.B. Mutationen im ADAMTS13-Gen tragen oder Auto-Antikörper aufweisen, welche eine korrekte Bindung des Enzyms an die Endothelzelloberfläche verhindern. Diese Vermutung wird insbesondere durch die Ergebnisse von Dong et al. [2002] erhärtet, welche zeigten, dass die Proteolyse des Von Willebrand Faktors an der Endothelzelloberfläche stattfindet (Kap. 1.4.1.). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte kürzlich nachweisen, dass sich die primäre Bindungsstelle für ADAMTS-13 in der A3-Domäne des VWF-Faktors (Abb. 1) befindet [Dong et al. 2003]. Theoretisch könnten die TMA-Patienten mit einer messbaren ADAMTS-13-Aktivität auch einen congenitalen oder erworbenen Defekt in der A2- oder A3-Domäne des Von Willebrand Faktors aufweisen. Grundsätzlich ergeben sich unzählige Möglichkeiten,

bei welchen die VWF-Proteolyse in vivo vermindert sein könnte, ohne dass man dabei eine erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität in vitro detektieren müsste.

Bei den zwei Patienten mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität bei akuter TTP aus unserem Patientenkollektiv lässt sich bemerkenswerterweise ein pathogener Einfluss der ADAMTS-13-katalysierten VWF-Proteolyse vermuten. Der Patient S.F. zeigte in seinem ersten Rezidiv (Tab. 9) eine hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität und im zweiten und dritten Rezidiv lediglich einen Abfall der ADAMTS-13-Aktivität von ca. 100% auf 23%. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass das erste Rezidiv durch einen ADAMTS-13-Mangel ausgelöst wurde, während die darauffolgenden Episoden durch andere Mechanismen verursacht wurden (und damit nach dem Vorschlag von Tsai [2003a] nicht als TTP bezeichnet werden sollten). Es ist viel wahrscheinlicher, dass die bislang unentdeckten auslösenden Faktoren der akuten TTP (s.o.) die verbleibende ADAMTS-13-Aktivität überspielt haben und es trotz einer Aktivität von 23% zur akuten Manifestation kam. Die Patientin M.S. zeigte bei einem akuten Rezidiv ebenfalls eine messbare ADAMTS-13-Aktivität (49%). In Remission zeigte die Patientin eine moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität von durchschnittlich 38%. Dies ist insofern bemerkenswert, da in der vorliegenden Arbeit nur Patienten mit klassischer TTP (d.h. Patienten mit dem typischem, schwerem ADAMTS-13-Mangel in der akuten Phase) oder Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen in Abwesenheit klinisch-akuter Manifestationen einen ADAMTS-13-Mangel zeigten. Der in vitro gemessene milde ADAMTS-13-Mangel könnte bei dieser Patientin auf ein defizientes Enzym hinweisen, welchem in vivo durchaus eine pathophysiologische Bedeutung zufallen könnte.

Zusammenfassend hat die hier dargestellte Debatte über den Zusammenhang zwischen dem ADAMTS-13-Mangel und TTP einige hilfreiche Studien angeregt und das wissenschaftliche Interesse für thrombotische Mikroangiopathien und insbesondere für ADAMTS-13 gefördert. Nichtsdestotrotz ist die Diskussion zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur von untergeordneter klinischer Bedeutung. Alle Kliniker sind sich einig, dass die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität, ob die TMA nun als HUS oder als TTP bezeichnet wird, hilfreiche therapeutische Hilfestellung und wertvolle pathophysiologischen Erkenntnisse bietet. Die hier diskutierten Studien und die eigenen Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass sich derzeit aus den isoliert betrachteten Befunden der ADAMTS-13-Aktivität nicht immer definierte und eindeutige Therapieregime ableiten lassen.

4.2.2. Zusammenhang zwischen der ADAMTS-13-Aktivität in Remission und der Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit TTP

In Remission zeigten die meisten TTP-Patienten eine vollständig normalisierte oder nur moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität. Die 18 Patienten in unserem Patientenkollektiv, welche in akuter Phase und in Remission untersucht wurden, zeigten in Remission eine normale (n=8), moderat erniedrigte (n=7) oder hochgradig erniedrigte (n=3) ADAMTS-13-Aktivität. Bei den 9 Patienten, die nur in Remission untersucht werden konnten, zeigte sich bei 2 Patienten ein hochgradiger ADAMTS-13-Mangel, während 4 Patienten eine moderat

erniedrigte und 3 Patienten eine normale ADAMTS-13-Aktivität aufwiesen. In der Literatur fehlen systematische Studien über die Bedeutung eines hochgradigen oder milden ADAMTS-13-Mangels bei TTP-Patienten in Remission. Es liegt nahe zu vermuten, dass die ADAMTS-13-Aktivität in Remission die Rezidivhäufigkeit wesentlich beeinflusst. Um diese Vermutung zu überprüfen wird in der Tabelle 21 der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität in Remission und Rezidivhäufigkeit für alle Patienten mit einem Beobachtungszeitraum ≥ 5 Monate dargestellt.

Tabelle 21: ADAMTS-13-Aktivität und Rezidivhäufigkeit für Patienten mit einem Beobachtungszeitraum ≥ 5 Monate

ED = TTP-Erstmanifestation, MW=Mittelwert

Bei dem Alter der Patienten, der Rezidiv-Anzahl pro Patient und dem Beobachtungszeitraum ist jeweils der Mittelwert und in Klammern der minimale und maximale Wert angegeben.

ADAMTS-13-Aktivität	Anzahl der Pat.	m/w	Alter bei ED [Jahre]	Anzahl der Rezidive pro Patient	Beobachtungszeitraum [Monate]	MW _{Rezidive} / MW _{Beobachtungszeitraum}
<6,25%	5	1/4	35 (19-53)	5 (0-9)	156 (75-253)	0,032
25-50%	10	3/7	29 (13-46)	1,3 (0-3)	77 (25-215)	0,017
>50%	10	4/6	40 (15-67)	0,3 (0-2)	39 (5-110)	0,008

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv zeigten die Patienten mit einem ADAMTS-13-Mangel in Remission, auch unter Berücksichtigung des unterschiedlich langen Beobachtungszeitraumes, eine durchschnittlich höhere Rezidivhäufigkeit. Dabei wird das Rezidivrisiko keinesfalls ausschließlich durch die ADAMTS-13-Aktivität determiniert. Eine Patientin blieb zum Beispiel seit ihrer TTP-Erstmanifestation vor 77 Monaten trotz anhaltender, hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität rezidivfrei. Ein anderer Patient erlitt dagegen in einem Beobachtungszeitraum von 5 Monaten 2 Rezidive trotz vollständiger Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität in Remission.

Diese Beobachtungen belegen, dass trotz des hinreichend diskutierten engen Zusammenhanges zwischen ADAMTS-13 und TTP eine akute TTP nicht ausschließlich durch einen schweren ADAMTS-13-Mangel ausgelöst wird. In der Literatur werden verschiedene auslösende Faktoren diskutiert, wie z.B. Infektionen, Medikamente (z.B. Ticlopidin), Antibiotika, Kontrazeptiva oder Schwangerschaft [Chemnitz et al. 2001b; Cines et al. 2000]. Es wird dabei postuliert, dass eine Endothelzellschädigung die akute TTP triggert. In den meisten Fällen tritt die TTP jedoch idiopathisch, d.h. ohne erkennbare auslösende Faktoren auf. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass der schwere ADAMTS-13-Mangel weniger als Auslöser, sondern vielmehr als Risikofaktor für die akute TTP-Manifestation bewertet werden sollte.

4.2.3. Inhibitoren gegen ADAMTS-13

Proben mit einem hochgradigen ADAMTS-13-Mangel wurden in der Regel auf inhibitorische Aktivität gegen ADAMTS-13 getestet. 17/20 Patienten (85%) zeigten in der akuten Phase einen messbaren Inhibitor (Nachweisgrenze: 0,4 U/ml) zwischen 0,4 und 62 U/ml. 3 Patienten zeigten trotz hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität keinen detektierbaren Inhibitor. 4 der 5 Patienten mit schweren ADAMTS-13-Mangel in Remission zeigten einen messbaren Inhibitor zwischen 0,7 und 64,5 U/ml. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den publizierten Studien (Tab. 22) bei denen in 53% bis 100% der Proben mit hochgradigem ADAMTS-13 ein Inhibitor detektiert werden konnte. Tsai und Lian [1998] und Furlan et al. [1998] konnten erstmalig nachweisen, dass bei Patienten mit erworbener TTP IgG Auto-Antikörper gegen ADAMTS-13 für die hochgradig erniedrigte Enzymaktivität verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit und in den meisten der unten aufgeführten Studien (Tab. 22) wurde die immunologische Natur der neutralisierenden Inhibitoren allerdings nicht nachgewiesen. Die detektierte inhibitorische Aktivität könnte demzufolge sowohl durch IgG-Auto-Antikörper oder anderer Antikörpertypen als auch durch andere Inhibitoren verursacht werden. Bei Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 ist daher keinesfalls der autoimmunologische Charakter einer TTP zweifelsfrei nachgewiesen.

Tabelle 22: Publierte Studien über Nachweis eines Inhibitors bei akuter TTP

Referenz:	Anteil der Inhibitor-positiven Proben von TTP-Patienten mit hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität
Furlan et al. 1998	100% (20/20)
Tsai und Lian 1998	67% (26/39)
Veradier et al. 2001	53% (31/59)
Tsai et al. 2001b*	76% (31//41)*
Vesely et al. 2003	94% (17/18)
Studt et al. 2003d	82% (36/44)
Vorliegende Arbeit	85% (17/20)

*Bei den dort untersuchten Serumproben von TTP-Patienten erfolgte keine Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität.

Es ist unklar, wie es ohne Nachweis eines Inhibitors zu einer hochgradigen Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität kommt. Theoretisch ergibt sich bei Patienten ohne Inhibitor der Verdacht einer congenitalen TTP. Die drei hier untersuchten Patienten ohne nachweisbaren Inhibitor bei hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität in der akuten Phase zeigten in Remission allerdings eine Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität (Tab. 9: Patienten Z.S.; G.D.; und S.F.). Die hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität in der akuten Phase kann bei diesen Patienten demnach nicht durch entsprechende Mutationen im ADAMTS13-Gen zurück geführt werden.

Es ergeben sich folgende mögliche Ursachen für den schweren ADAMTS-13-Mangel bei diesen Patienten:

- Der Sensitivität des Testes reicht nicht aus, um niedrigtitrige Inhibitoren zu detektieren.
- Die Inhibitoren gegen ADAMTS-13 sind überwiegend im extravaskulärem Raum, an der Endothelzell- oder an den Thrombozytenoberfläche lokalisiert und demzufolge nicht (oder nur teilweise) im Plasma nachweisbar.
- Die (u.U. nicht immunologischen) inhibitorischen Substanzen verlieren bei Gewinnung des thrombozytenarmen Plasmas ihre Fähigkeit zur Hemmung der ADAMTS-13-Aktivität.
- Die erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität beruht nicht auf eine Inhibierung des Enzymes, sondern resultiert aus anderen Mechanismen wie z.B. Enzymverlust durch Bindung an zelluläre Strukturen, verminderte Synthese, verringerte Aktivierung, gesteigertes Clearance oder unverhältnismäßig hoher Verbrauch.

Die erstgenannten Hypothesen erscheinen dabei für einige Proben sehr wahrscheinlich, da der Inhibitortiter bei einigen Inhibitor-positiven Patienten in Remission zwischen $<0,4$ und 2 U/ml schwankte. D.h. in einigen Proben ließ sich bei den betreffenden Patienten ein Inhibitor detektieren, während andere Proben des gleichen Patienten trotz konsistentem und hochgradigem ADAMTS-13-Mangel keinen nachweisbaren Inhibitor zeigten. Demzufolge liegt es nahe zu vermuten, dass bei Proben mit negativem Inhibitor die Sensitivität des Testes nicht ausreicht, um neutralisierende Antikörper nachzuweisen. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Tsai [2003a] untermauert. Tsai konnte zeigen, dass bei Inhibitor-negativen Proben mit schwerem ADAMTS-13-Mangel inhibitorische Aktivität nachweisbar ist, wenn man den Test mit aufgereinigten IgG-Antikörpern des Patienten durchführt

Scheifflinger et al. [2003] haben kürzlich einen nicht-funktionalen Test zum Nachweis von Antikörpern gegen ADAMTS-13 entwickelt. Dabei wird zunächst das rekombinant hergestellte Protein ADAMTS-13 an Mikrotiterplatten gebunden. Dann wird die zu testende Probe in die Mikrotiterplatte gegeben und für eine ausreichende Zeit inkubiert. Anschließend erfolgt der Nachweis der, an ADAMTS-13 gebundenen, Antikörper aus der getesteten Probe durch Zugabe eines Peroxidase-konjugierten-Anti-IgG oder Anti-IgM-Antikörpers. Scheifflinger et al. [2003] konnten zeigen, dass bei Anwendung dieses Antikörper-Testes in Proben ohne nachweisbare inhibitorische Aktivität Auto-Antikörper gegen ADAMTS-13 detektiert werden können. In nächster Zukunft werden die hier untersuchten Plasmaproben mittels dieser Methode zum Nachweis der Antikörper gegen ADAMTS-13 getestet. Die Ergebnisse werden zeigen, inwieweit Antikörper gegen ADAMTS-13 für die Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität bei den hier untersuchten TTP-Patienten verantwortlich sind. Zudem ist die Etablierung eines ADAMTS-13-Antigen Testes geplant. Der Gehalt am ADAMTS-13-Antigen in den hier untersuchten Plasmaproben sollte zeigen, ob eine

erniedrigte ADAMTS-13 Konzentration (z.B. durch verminderter Synthese oder gesteigertem Verbrauch) bei den verschiedenen Patienten nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassend können zur Zeit keine der oben genannten Hypothesen eindeutig bestätigt oder aber ausgeschlossen werden. Theoretisch könnte eine Kombination verschiedenartiger Ursachen vorkommen, welche letzten Endes für die hochgradig erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität verantwortlich sind.

Man sollte allerdings bei Nachweis eines Inhibitors gegen ADAMTS-13 eine congenitale TTP nicht zweifelsfrei ausschließen. Veyradier et al. [2001] fanden in ihrem untersuchten Patientenkollektiv einen Patienten mit familiärer TTP und positivem Inhibitor. Studt detektierte ebenfalls einen Inhibitor bei einem Patienten mit vermutlich congenitaler TTP [mündliche Mitteilung, Studt 2003]. Die Bildung von Allo-Antikörpern wird bei 15%-52% Patienten mit schwerer Hämophilie A beobachtet [Ehrenforth et al. 1992; Rothschild et al. 1998; Scharrer et al. 1999] und sollte bei Patienten mit congenitaler TTP auch einkalkuliert werden.

Der positive Nachweis eines Inhibitors ist für die Erwägung alternativer Therapiekonzepte (Splenektomie, Immunadsorption, Rituximab, Kap. 1.3.3.) unerlässlich. In jedem Fall sollte in nächster Zukunft der funktionale Inhibitor-Test in seiner Sensitivität verbessert werden und gegebenenfalls durch den ELISA-basierten, nicht-funktionalen Antikörper-Test ersetzt bzw. mit demselben kombiniert werden.

Angesichts der oben diskutierten Debatte über die Spezifität des ADAMTS-13-Mangels ist es bemerkenswert, dass der positive Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 in der Literatur eine beispiellos hohe Spezifität von nahezu 100% für die akute TTP aufweist. Unter allen publizierten Fällen wurde bislang nur ein Fall beschrieben, bei welchem inhibitorische Aktivität gegen ADAMTS-13 bei einem Patienten ohne TTP detektiert wurde [Hunt et al. 2001]. Dieser Patient hatte eindeutig eine D+HUS mit positivem Nachweis von E.coli 0157, erlitt allerdings auch TTP-typische, neurologische Symptome.

Für den Inhibitor-Titer ergibt sich in dem hier untersuchten Patientenkollektiv statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen Erstmanifestation, Rezidiv und Remission ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Analysiert man die Patienten im einzelnen, ergeben sich überraschenderweise auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Erstmanifestation und Rezidiv bzw. zwischen Rezidiv und Remission. Die Patientin Ah.M. zeigte z.B. vor und bei ihrem letzten Rezidiv einen nahezu gleichbleibenden Inhibitor-Titer von 64 bzw. 62 U/ml (Abb. 33 B). Man kann demzufolge bei dieser Patientin ausschließen, dass das Rezidiv durch einen Anstieg des Inhibitor-Titers verursacht wird. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wird das Krankheitsstadium nicht oder nur sehr geringfügig durch die Konzentration des Inhibitors determiniert. Im folgenden wird die Beziehung zwischen Inhibitor-Titer und klinischem Verlauf der TTP (Kap. 4.2.3.-4.2.4) noch eingehender diskutiert.

Eine Patientin aus dem hier untersuchten Kollektiv mit sporadischer TTP (ohne Rezidiv seit Erstmanifestation vor 77 Monaten) zeigte in Remission einen kontinuierlichen und hochgradigen ADAMTS-13-Mangel ohne Nachweis eines Inhibitors. Es ergibt sich demzufolge der Verdacht auf eine congenitale TTP. Die Familienuntersuchung zeigte allerdings normale ADAMTS-13-Aktivität bei beiden Elternteilen und dem Sohn der Patientin, was einen genetisch bedingte ADAMTS-13-Mangel wiederum sehr unwahrscheinlich macht.

4.2.4. Wirkung der Plasmapherese-Therapie auf die ADAMTS-13-Aktivität und den Inhibitortiter

Die in den Kapiteln 1.3. bis 1.4. dargestellten Erkenntnisse über die Pathophysiologie der TTP bieten eine Erklärung für die Wirksamkeit der PP-Therapie: Die Plasmapherese führt zu einer Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität, indem auf der einen Seite das Enzym substituiert wird und auf der anderen Seite neutralisierende Auto-Antikörper entfernt werden [Furlan und Lämmle 1999; Tsai 2003a; Pham et al. 2002; Moake 2002a+b]. Die erfolgreiche Substitution von ADAMTS-13 durch die Gabe von FFP ist vielerorts belegt worden [Barbot et al. 2001; Kentouche et al. 2002; Allford et al. 2000; Furlan et al. 1999]. Die therapeutisch wirksame Entfernung von Auto-Antikörpern gegen ADAMTS-13 wurde dagegen bislang noch nicht zweifelsfrei bewiesen.

Die Ergebnisse unter 3.2.3. zeigen, dass die PP-Therapie bei Vorliegen eines schweren ADAMTS-13-Mangels (n=20) in 15 TTP-Episoden (75%) bei 14 Patienten einen Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität mit einer letztendlichen Erniedrigung des Inhibitortiters auf <0,4 U/ml induzierte. Der Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität ist bei diesen Patienten eng mit dem Verlauf der Thrombozytenanzahl korreliert. 4/10 Patienten mit einer TTP-Erstmanifestation (40%) zeigten unter PP-Therapie einen erneuten, vorübergehenden Abfall der ADAMTS-13-Aktivität auf <6,25%, welcher mit einem Anstieg des Inhibitortiters und einem Abfall der Thrombozyten korreliert war. In 5 von 20 untersuchten TTP-Episoden (25%) bei 5 verschiedenen Patienten kam es trotz hinreichender klinischer Response nicht zu einem messbaren Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität im gesamten Verlauf der PP-Behandlung. Die PP-Therapie führte bei 3 von diesen 5 Patienten zu einer Erniedrigung des Inhibitortiters. Bei 2 Patienten kam es dagegen unter Plasmatherapie zu einem etwa 10fachen Anstieg des Inhibitortiters. Zusammenfassend induzierte die PP-Therapie in 75% der untersuchten Episoden einen dauerhaften Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität auf 13-100% mit einer Erniedrigung des Inhibitortiters auf <0,4 U/ml. In 15% der untersuchten Episoden führte die PP-Therapie zu einer Erniedrigung des Inhibitortiters ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität und in 10% der Episoden kam es im Verlauf der PP-Therapie zu einem permanenten Anstieg des Inhibitortiters.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, worin die therapeutische Wirksamkeit der Plasmapherese-Therapie ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität besteht. Theoretisch ergeben sich folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- Die PP entfernt einen bislang nicht identifizierten pathogenen Faktor.
- Die PP fügt einen bislang nicht identifizierten therapeutisch wirksamen Faktor hinzu.
- Die PP führt zu einem kurzzeitigem Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität in vivo.
- Die in vitro gemessene ADAMTS-13-Aktivität spiegelt die tatsächliche in-vivo Aktivität nur sehr unzureichend wieder.

Eine Kombination der beiden letztgenannten Hypothesen erscheint, insbesondere angesichts der in Kapitel 1.4.1. dargestellten Untersuchungen von Dong et al. [2002] am wahrscheinlichsten. Dong et al. [2002] zeigten, dass durch Histamin stimulierte Endothelzellen VWF sezernieren, welcher an der Zelloberfläche hängen bleibt und dort nach Zugabe von ADAMTS-13 umgehend gespalten wird. Diese Beobachtungen hat folgende Konsequenzen:

- In vivo erfolgt die VWF-Proteolyse wahrscheinlich innerhalb weniger Sekunden. Eine vorübergehende Erhöhung der ADAMTS-13-Aktivität während der PP-Sitzung könnte demnach theoretisch den Prozess der Hyperaggregation hinreichend hemmen.
- Die in vitro gemessene ADAMTS-13-Aktivität (und damit auch der funktional gemessene Inhibitor gegen ADAMTS-13) muss nicht mit der in vivo Aktivität korrespondieren. Erste Ergebnisse von Amar et al. [2002] bestätigen diese Vermutung. Amar et al. haben für zwei Patienten die ADAMTS-13-Aktivität mittels der Immunoblotting-Methode (Kap. 1.5.1.) und mittels des Endothelzell-basierten Testes (Kap. 1.5.7.) gemessen. Ein Patient zeigte nach FFP-Infusion eine anhaltende nicht messbare ADAMTS-13-Aktivität in dem Immunoblotting-Test, während die gleiche Probe in dem Endothelzell-basiertem Test eine Aktivität von 28% zeigte.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv wurde bei 6/19 Patienten (32%) ein transienter oder permanenter Anstieg des Inhibitortiters unter PP-Therapie beobachtet. Bemerkenswerterweise ist der Anstieg des Inhibitortiters bei Patienten mit Erstmanifestation der TTP (n=5) immer transient und mit dem Auftreten schwerer klinischer Symptome verbunden. Der Anstieg des Inhibitortiters bei Patienten mit einem Rezidiv der TTP (n=2) ist demgegenüber permanent und nicht mit dem Auftreten schwerer klinischer Symptome assoziiert. In der Literatur wurde ein Anstieg des Inhibitortiters in bislang in 4 Kasuistiken beschrieben (Tab. 23).

Tabelle 23: Publierte Kasuistiken mit einem Anstieg des Inhibitortiters unter PP-Therapie

Referenz:	ED/Rezidiv	transient/ permanent	Therapie-Erfolg
Furlan et al. 1998b	Rezidiv	permanent	Halbremission durch PP
Tsai 2000	Rezidiv	permanent	unter PP-Therapie verstorben
Zheng et al. 2001b	Rezidiv	permanent	PP erfolgreich
Knöbl et al. 2003a	ED	transient	Immunadsorption erfolgreich

Bei den publizierten Fällen wurde eine therapeutische Wirksamkeit der PP trotz steigendem Inhibitortiter in 2/3 Patienten beobachtet. Es ist erwähnenswert, dass sich auch in der Literatur kein Patient findet, welcher in einer TTP-Erstmanifestation einen permanent steigendem Inhibitortiter zeigte und dabei erfolgreich mit PP behandelt wurde. Daraus ergeben sich folgende Spekulationen:

- Die Patienten mit einer rezidivierenden TTP zeigten einen permanenten Anstieg des Inhibitortiters aufgrund ihrer Vorbehandlung mit FFP. Bei der PP-Therapie kommt es bei diesen Patienten evt. aufgrund der erneuten und anhaltenden Antigenpräsentation zur gesteigerten Synthese von Antikörpern gegen ADAMTS-13 (anamnestische Response auf FFP). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Patientin B.M. (Tab. 9) initial mit FFP behandelt worden ist, was eine gesteigerte Antikörperproduktion evt. begünstigte. Bei der Patientin T.H. (Tab. 9), die einen Anstieg des Inhibitortiters während PP-Therapie von 4,3 auf 52 U/ml zeigte, handelte es sich bei der untersuchten Episode um das 8.Rezidiv. Sie ist damit in dem untersuchten Kollektiv neben dem Patient H.P. (Tab. 9) die Patientin mit den meisten Rezidiven. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass eine hohe Anzahl der Vorbehandlungen den Anstieg des Inhibitortiters während der PP begünstigt. Auf der anderen Seite wäre es natürlich auch möglich, dass Patienten mit einer Tendenz zum Anstieg des Inhibitortiters eine höhere Rezidivhäufigkeit zeigen als andere Patienten.
- Der Anstieg des Inhibitortiters war bei Patienten mit Erstmanifestation (im Gegensatz zu Rezidiv-Patienten) stets mit schweren klinischen Symptomen assoziiert. Patienten können auch bei kontinuierlichem schweren ADAMTS-13-Mangel in einer TTP-Erstmanifestation erfolgreich mit PP behandelt werden (Abb. 32 C). Es lässt sich demnach spekulieren, dass bei Patienten mit einem transienten Anstieg des Inhibitortiters in der Erstmanifestation die fehlende ADAMTS-13-Aktivität nicht (oder nur teilweise) für die schweren klinischen Symptome verantwortlich ist. Der Anstieg des Inhibitortiters bei Patienten mit Erstmanifestation ist u.U. nur ein Anzeichen für andere pathophysiologisch bedeutsame Prozesse, welche eine Verschlechterung der klinischen Symptome nach sich zieht. Dies steht im Gegensatz zu dem Anstieg des Inhibitortiters bei Rezidiv-Patienten, welche wahrscheinlich auf einer anamnestischen Response auf FFP beruht.

Es bleibt festzustellen, dass ein Anstieg des Inhibitortiters unter Plasmapherese kein seltenes Ereignis ist. Eine allgemeingültige Kausalität zwischen steigendem Inhibitortiter, fehlender ADAMTS-13-Aktivität und klinischer Symptomatik lässt sich jedoch noch nicht widerspruchsfrei herstellen.

Der initiale Inhibitortiter bestimmt in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nicht das Ansprechen auf Plasmapherese-Therapie. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Tsai et al. [2001b]. Die Autoren fanden, dass Patienten mit einem hohen Inhibitortiter (>2 U/ml) ein, im Vergleich zu Patienten mit niedrigtitrigem Inhibitor (<2 /ml), verzögertes Ansprechen auf PP-Therapie zeigten. Bei dieser Untersuchung wurde allerdings keine ADAMTS-13-Aktivitätsmessung durchgeführt, d.h. in dem untersuchten Kollektiv könnten sich auch Patienten mit messbarer ADAMTS-13-Aktivität befinden.

Der klinische Verlauf der akuten TTP-Episode wird in der vorliegenden Studie des weiteren weder von der initialen Thrombozytenanzahl bzw. dem CRP-Spiegel bei Therapiebeginn noch von dem Alter der Patienten determiniert

Aus den Ergebnissen im Kapitel 3.2.3. lassen sich zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die *in vitro* gemessene ADAMTS-13-Aktivität erklärt nicht vollständig die pathophysiologisch wirksamen Prozesse der akuten TTP.
- Bislang unentdeckte pathogene Mechanismen determinieren das klinische Bild der TTP.
- Die therapeutische Wirksamkeit der Plasmapherese-Therapie bleibt auch nach der Entdeckung von ADAMTS-13 eine weitgehend empirische, aber äußerst wirksame Therapie.

4.2.5. Verlauf von ADAMTS-13-Aktivität und Inhibitortiter in Remission

Bei 4 Patienten (M.A., Ah.M., T.H. und H.P.) mit einem permanenten und schwerem ADAMTS-13-Mangel während der PP-Therapie konnte der Langzeitverlauf des Inhibitortiters und der ADAMTS-13-Aktivität in klinischer Remission beobachtet werden. Die Patientin M.A. (Abb. 34 A) zeigte nach dem Absetzen der PP- und der begleitenden Corticosteroid-Therapie einen kontinuierlichen Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität mit Erniedrigung des Inhibitortiters auf $<0,4$ U/ml in den ersten 12 Monaten nach ihrer Erstmanifestation. In den darauffolgenden 8 Monaten bis zu ihrem ersten Rezidiv wurde ein erneuter, spontaner Abfall der ADAMTS-13-Aktivität mit einem Anstieg des Inhibitortiters auf $2,4$ U/ml beobachtet. Angesichts des Zusammenhanges zwischen ADAMTS-13-Aktivität in Remission und Rezidivhäufigkeit (Kap. 4.2.2.) liegt es nahe zu vermuten, dass der

steigende Inhibitor-titer das TTP-Rezidiv bei dieser Patientin nicht ausgelöst, aber sehr wohl begünstigt haben könnte.

Bei der Patientin Ah.M. (Abb. 34 B) kam es dagegen in Remission zu einer spontanen Rückbildung des Inhibitors auf 52-43 U/ml und sie erreichte damit 3 Monate nach ihrem Rezidiv einen ähnlich hohen Inhibitorspiegel wie vor bzw. bei ihrem Rezidiv. Der Anstieg des Inhibitor-titers war in dem gegebenen Beobachtungszeitraum bei dieser Patientin nicht mit einer erneuten TTP-Episode assoziiert. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Patientin trotz ihres ausnehmend hohen Inhibitor-titers von 62–65 U/ml vor ihrem letzten Rezidiv im März 2003 51 Monate keine akute TTP-Manifestation erlitt. In der Literatur fehlen bislang Studien über den Langzeitverlauf des Inhibitor-titers ohne weiterführende Therapie. Die hier dargestellten Kasuistiken belegen, dass sich der Inhibitor in Remission nicht gleichförmig verhält und je nach Patient variiert. Zur Zeit können, wie in den Kapiteln 4.2.3. und 4.2.4. bereits diskutiert, keine allgemeingültigen Korrelationen zwischen Inhibitor-titer und Krankheitsverlauf aufgestellt werden.

Die Patientin T.H. wurde aufgrund ihres ansteigenden Inhibitor-titers am Tag 26 und am Tag 32 ihrer PP-Behandlung mit Rituximab (375 mg/m²) behandelt. Rituximab ist ein chimärer Maus/Mensch monoklonaler Antikörper gegen CD20, welcher spezifisch die Anzahl der B-Zellen erniedrigt und somit die Produktion von Antikörpern hemmt [Johnson und Glennie 2001]. In der Tabelle 24 sind bislang alle in der Literatur publizierten Fälle mit einer Rituximab-Therapie bei TTP dargestellt.

Von den 11 bislang publizierten Fällen folgte der Rituximab-Gabe bei 8/11 Patienten (73%) eine klinisch-vollständige Response und bei 2/11 Patienten eine partielle Response. Ein Patient zeigte kein messbares Ansprechen auf Rituximab-Gabe. Die Kausalität zwischen Therapie und klinischer Remission ist allerdings, insbesondere aufgrund adhärenter Therapien, nicht immer eindeutig nachweisbar. Insbesondere die zeitgleiche Gabe von Vincristin® ist für die Bewertung einer therapeutischen Wirksamkeit der Rituximab-Gabe schwierig. Die Vincristin®-Gabe induzierte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv stets einen Anstieg der Thrombozyten innerhalb weniger Tage (Abb. 32 D, F-I). Die bei Ahmad et al. [2002] und Chemnitz et al. [2002] beobachtete Normalisierung der Thrombozyten nach Rituximab- bzw. Vincristin®-Gabe kann demnach nicht eindeutig auf die Therapie mit Rituximab zurückgeführt werden. Es ist allerdings theoretisch möglich, dass die kombinierte Gabe von Vincristin® und Rituximab einen synergetischen therapeutischen Effekt hat.

Tabelle 24: Publierte Kasuistiken von TTP-Patienten mit Rituximab-Therapie

n.b. = nicht bestimmt; Pt = Patient; PP = Plasmapherese

Referenz:	Anzahl der Fälle	Response	Therapie neben Rituximab	Sonstiges
Tsai und Shulman 2003	1	Remission mit Abfall des Inhibitor-titers und Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität	keine	Atypische TTP ohne Hämolyse und Thrombopenie, aber rezidivierende cerebrale Ischämie
Zheng et al. 2003	1	Remission mit Abfall des Inhibitor-titers und Anstieg der ADAMTS-13 Akt.	Cyclophosphamid	
Gutterman et al. 2002	3	<u>Pt 1:</u> Remission (ADAMTS-13-Aktivität n.b.) <u>Pt 2:</u> Partielle Remission mit Abfall des Inhibitor-titers und Anstieg der ADAMTS-13 Akt., Rezidiv 17 Monaten nach Rituximab-Therapie <u>Pt 3:</u> Partielle Remission mit Abfall des Inhibitor-titers aber kontinuierlichem, schwerem ADAMTS-13-Mangel, nach 60 Tagen aufgrund anderer Ursachen verstorben	<u>Pt 1-2:</u> keine (PP am Tag vor Rituximab eingestellt) <u>Pt 3:</u> PP	
Ahmad et al. 2002	4	<u>Pt 1-2:</u> Remission (ADAMTS-13-Aktivität n.b.) <u>Pt 3:</u> Ohne Response mit persistierendem ADAMTS-13-Mangel (Inhibitor positiv) <u>Pt 4:</u> Remission mit transientem Abfall des Inhibitor-titers	<u>Pt 1-2:</u> PP, Steroide und Vincristin® <u>Pt 3:</u> PP <u>Pt 4:</u> Steroide und Vincristin®	Pt 1-3: Zeitraum zwischen Vincristin® und Rituximab weniger als 2 Tage, Normalisierung der Thr. 7-14 Tage nach erster Rituximab-Gabe
Chemnitz et al. 2001 und 2002	2	<u>Pt 1-2:</u> Remission mit Abfall des Inhibitor-titers und Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität bei Pt 1 (Pt 2: ADAMTS-13-Aktivität n.b.)	<u>Pt1-2:</u> PP, Steroide und Vincristin®	Pt 1-2: Zeitraum zwischen Vincristin® und Rituximab < 2 Tagen (s.o.), Normalisierung der Thr. 7-24 Tage nach erster Rituximab-Gabe

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass Rituximab in einzelnen Fällen nicht nur eine klinische Remission induziert, sondern zudem eine Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität mit einer dauerhaften Eliminierung des Inhibitor-titers nach sich zieht. Die hier mit Rituximab behandelte Patientin zeigte 24 Tage nach erster Rituximab-Gabe eine anhaltende Stabilisierung der Thrombozytenanzahl. Da die Patientin allerdings bis dahin kontinuierlich mit Plasmapherese behandelt wurde, lässt sich nicht zweifelsfrei belegen, ob die Rituximab-Therapie bei Einleitung der klinischen Remission entscheidend beteiligt war. Zudem kam es auch nach Therapie mit Rituximab zu einem Anstieg des Inhibitor-titers von 22 auf 52 U/ml. Wenn man von einer wirksamen Rituximab-vermittelten Erniedrigung der Inhibitor-produzierenden B-Zellen ausgeht, ist dies, auch unter Berücksichtigung einer IgG-

Halbwertszeit von 20 Tagen, nicht erklärbar. Der Anstieg des Inhibitortiters unter PP-Therapie beruht bei der Patientin evt. auf einer „anamnestischen Response auf FFP“ (Kap. 4.2.4.). In Remission kommt es bei der Patientin in den darauffolgenden 17 Monaten zu einem kontinuierlichen Abfall des Inhibitortiters auf durchschnittlich 1 U/ml. Der Abfall des Inhibitortiters ist unter den gegebenen Umständen wahrscheinlich vielmehr eine Folge der Beendigung der PP-Therapie (und damit eine Beendigung der kontinuierlichen Antigenpräsentation) als eine Spätfolge der Rituximab-Therapie. Die fehlende Wirkung der Rituximab-Gabe könnte bei dieser Patientin in der begleitenden PP-Therapie begründet liegen. Die Patientin wurde jeweils am Tag nach Rituximab-Gabe mit PP behandelt. Es könnte sein, dass Rituximab durch die PP entfernt wird, bevor der Antikörper die betreffenden B-Zellen wirksam eliminiert hat. In der Literatur finden sich allerdings derzeit keine umfassenden, pharmakokinetischen Studien, um diese Vermutung bestätigen bzw. widerlegen zu können.

Die Splenektomie bei Patient H.P. induzierte eine anhaltende, klinische Remission in dem gegebenen Beobachtungszeitraum (24 Monate). Nach Splenektomie kam es zunächst zu einem transienten Anstieg des Inhibitortiters. Im weiteren Verlauf erniedrigte sich der Inhibitortiter auf <1U/ml, allerdings ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität. In der Literatur wurde der Zusammenhang zwischen Splenektomie, klinischer Remission und ADAMTS-13-Aktivität bzw. Inhibitortiter bislang in 2 Kasuistiken beschrieben [Furlan et al. 1998b; Langer et al. 2002]. In beiden Fällen induziert die Splenektomie eine anhaltende, klinische Remission. Furlan et al. [1998b] beobachteten 21 Tage nach Splenektomie eine Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität mit begleitender Eliminierung des Inhibitors. Langer et al. [2002] beobachteten demgegenüber trotz Splenektomie-induzierter klinischer Remission einen anhaltenden, schweren ADAMTS-13-Mangel mit einem Inhibitortiter >1 U/ml innerhalb der ersten 6 Monate nach Entfernung der Milz. 9 Monate nach Splenektomie kam es bei diesem Patienten erstmalig zu einem Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität auf 10% bei nicht nachweisbarem Inhibitor.

Bei dem in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten konnte trotz sinkendem Inhibitortiter und anhaltender Remission nach Splenektomie im gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Monaten keine ADAMTS-13-Aktivität detektiert werden. Der Patient benötigte vor Splenektomie für eine anhaltende Stabilisierung der Thrombozytenanzahl regelmäßige PP-Behandlungen (1-2 Behandlungen/Woche). Die Splenektomie bewirkte auch bei einem Inhibitortiter größer als 1 U/ml innerhalb der ersten 5 Monaten nach dem Eingriff eine stabile Remission. Demnach ist der sinkende Inhibitortiter sehr wahrscheinlich eine Folge und keinesfalls die Ursache der Splenektomie-induzierten Remission. Angesichts der Ergebnisse bei der oben diskutierten Patientin T.H. lässt sich bei diesem Patienten die Erniedrigung des Inhibitortiters wahrscheinlich ebenfalls auf eine Beendigung der PP-Therapie zurückführen.

Wie im vorhergehenden Kapitel bereits diskutiert, zeigen die hier dargestellten Fälle wiederum die Herbeiführung bzw. die Stabilisierung einer klinischen Remission ohne

nachweisbare Beteiligung der ADAMTS-13-Aktivität. Falls die Splenektomie tatsächlich keine wirksame Entfernung der ADAMTS-13-Antikörper-produzierenden Zellen induziert, bleibt der pathophysiologische Wirkungsmechanismus der Splenektomie ungeklärt. Theoretisch könnten andere Antikörper-produzierenden Zellen entfernt werden, welche eine bislang unentdeckte Bedeutung in der akuten TTP-Manifestation inne haben. Die therapeutische Wirksamkeit der Splenektomie könnte allerdings auch auf andere, nicht-immunologische Funktionen der Milz, wie z.B. den Abbau von Thrombozyten basieren.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, das in der Literatur auch Splenektomie-refraktäre Fälle beschrieben worden sind [De la Rubia et al. 2000; Schwartz et al. 2001; Gutterman et al. 2002; Thompson et al. 2003]. Allerdings wurde bei diesen Patienten eine congenitale TTP nicht zweifelsfrei ausgeschlossen, welche naturgemäß Splenektomie-refraktär sein sollte.

Ein Großteil der unter Kapitel 4.2. diskutierten Ergebnisse wurden bereits in Form von Vorträgen und Postern auf nationalen und internationalen Kongressen [Böhm et al. 2001, Böhm et al. 2002 a,b+d, Böhm et al. 2003 b-c] veröffentlicht.

4.3. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit diversen hämatologischen Erkrankungen

Die 108 untersuchten Patienten mit diversen, hämatologischen Erkrankungen zeigten eine ADAMTS-Aktivität zwischen 14 und 139%. Keiner der Patienten zeigte einen schweren ADAMTS-13-Mangel (<6,25%). Die Untersuchungen belegen damit die bereits im Kapitel 4.2. diskutierte Spezifität des schweren ADAMTS-13-Mangels für die TTP. Die 15 untersuchten Patienten mit HUS demonstrierten ADAMTS-13-Aktivitäten zwischen 30 und 92%. Remuzzi et al. [2002] fanden dagegen einen schweren ADAMTS-13-Mangel in 56% der getesteten Patienten mit HUS. Ein milder ADAMTS-13-Mangel wurde in der Studie von Remuzzi et al. [2002] nur in 1/16 Patienten mit HUS gefunden. Unsere Ergebnisse bei den Patienten mit HUS bestätigen die Studien von Furlan et al. [1998], Mori et al. [2002], Studt et al. [2003], Hulstein et al. [2003] und Fujimura [2003]. In diesen letztgenannten Studien beschränkte sich der hochgradige ADAMTS-13-Mangel ebenfalls auf Patienten mit TTP, während alle Patienten mit HUS eine normale oder nur moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität aufwiesen. Die diskrepanten Ergebnisse der verschiedenen Studien werden an dieser Stelle nicht näher diskutiert, da sie bereits im vorhergehenden Kapitel hinreichend erläutert wurden.

Ein milder ADAMTS-13-Mangel (12,5-54%) fand sich im Gegensatz zum schweren ADAMTS-13-Mangel bei einer Vielzahl von Erkrankungen (HUS; KMT assoziierter TMA; Hämolyse unklarer Genese; APS; Sepsis; Herzinfarkt; CAPS, Mesenterialvenenthrombose; Lungenembolie; HELLP-Syndrom; ischämischer Schlaganfall; AML; Purpura rheumatica; Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation und DIC). Eine reduzierte ADAMTS-13-

Aktivität bei Patienten mit Sepsis wurde bereits von Bianchi et al. [2002a+b] gefunden. Loof et al. [2001] haben bei Patienten mit DIC bereits 2001 einen ADAMTS-13-Mangel nachgewiesen. Lattuada et al. [2003] haben kürzlich ebenfalls eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit HELLP-Syndrom beschrieben. Die vorliegende Studie zeigt erstmalig eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit massiven Blutungen; Herzinfarkt; CAPS; Mesenterialvenenthrombose; Lungenembolie; ischämischem Schlaganfall, Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation, AML und Purpura rheumatica. Die reduzierte ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit HELLP-Syndrom könnte auf eine verminderte Lebersyntheseleistung zurückgeführt werden, da ADAMTS-13 vorwiegend in der Leber synthetisiert wird [Levy et al. 2001; Soejima et al. 2001]. Bei den Patienten mit HUS und der Patientin mit Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation könnte das Nierenversagen für die Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität verantwortlich sein, da Urämiker gelegentlich eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität aufweisen [Mannucci et al. 2001].

Es ist bemerkenswert, dass über 80% der zufällig ausgewählten Patienten mit intensivpflichtigen Erkrankungen eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität aufwiesen. Die Vielzahl der untersuchten Erkrankungen zeigt, dass es sich dabei nicht um einen Krankheits-spezifischen Effekt handelt. In Remission findet sich bei allen untersuchten Patienten eine Normalisierung der ADAMTS-13-Aktivität. Die hier gefundene Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten in der akuten Manifestation diverser Erkrankungen ist demnach sehr wahrscheinlich eine Akut-Phasen-Reaktion. Diese Vermutung wird durch eine Studie von Mannucci et al. [2001] erhärtet, welche bei Patienten mit akuten Infektionen ebenfalls eine moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität beschrieb. Die Ursache und Bedeutung einer erniedrigten ADAMTS-13-Aktivität in der akuten Phase ist völlig unklar. Der VWF ist ein Akut-Phasen-Protein, welches bei bestimmten Stimuli vermehrt produziert bzw. aus dem Endothel freigesetzt wird. Unter diesen Bedingungen könnte es möglicherweise zu einem gesteigerten Verbrauch von ADAMTS-13 kommen.

Diese Spekulation werden von den jüngsten Studien von Reiter et al. [2003] gestützt. Reiter et al. [2003] fanden eine Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität auf ca. 50% des Ausgangswertes nach Gabe von Desmopressin. Desmopressin induziert eine Freisetzung von VWF aus den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen und ist aus diesem Grund eine gängige Therapie bei Patientin mit Von Willebrand Syndrom, Typ I. Die Autoren vermuteten als Ursache für die Desmopressin-induzierte Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität einen gesteigerten Verbrauch von ADAMTS-13. Die gleiche Arbeitsgruppe findet auch nach Infusion von E.coli-Endotoxin eine Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität [Knöbl et al. 2003b]. E.coli-Endotoxin induziert eine Akut-Phasen-Reaktion, bei welcher der VWF:Ag-Spiegel im Plasma um mehr als das Zweifache ansteigt. Die Desmopressin induzierte Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität wurde allerdings von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt. Sowohl Mannucci et al. [2001] als auch Farías et al. [2003] fanden keine Desmopressin-induzierte Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität.

Bei den meisten der hier dargestellten Krankheitsbilder kommt es zu einer pathologisch gesteigerten Gerinnungsaktivität, welche, unabhängig von einer verstärkten Freisetzung des VWF-Faktors, einen erhöhten Verbrauch von ADAMTS-13 nach sich ziehen könnte. Die Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität könnte allerdings auch eine primäre Akut-Phasen-Reaktion sein. Um dies zu klären, könnte man z.B. den Effekt einer E.coli-Endotoxin-Gabe bei VWF-Mangel-Mäusen untersuchen.

Systematische Studien sollten durchgeführt werden, um die pathophysiologische Bedeutung der erniedrigten ADAMTS-13-Aktivität bei den verschiedenen Erkrankungen zu ergründen. Insbesondere bei hämostaseologischen Erkrankungen, welche mit einer Hyperkoagulabilität einhergehen (Sepsis, DIC, HUS, Herzinfarkt, Schlaganfall), könnte ADAMTS-13 durchaus eine pathophysiologisch wichtige Bedeutung inne haben. ADAMTS-13 ist der bislang einzig bekannte physiologische Regulator der VWF-Aktivität (Kap. 1.4.3.). Man könnte ADAMTS-13 demnach auch als einen Inhibitor der primären Hämostase bezeichnen. Unter diesem Gesichtspunkt ist ADAMTS-13 (z.B. als rekombinantes Protein) ein potentielles Therapeutikum für die akute Behandlung von Erkrankungen mit einer begleitenden oder ursächlichen Hyperkoagulabilität, wie z.B. DIC, Sepsis, Herzinfarkt, Schlaganfall oder andere thromboembolische Erkrankungen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass ADAMTS-13 neben der Spaltung des Von Willebrand Faktors andere bisher unentdeckte Funktionen innehaben könnte, welche den hier diskutierten Effekt der erniedrigten Enzymaktivität verursachen könnten.

Ein Teil der hier diskutierten Ergebnisse wurden bereits Böhm et al. [2003f] publiziert.

4.4. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen untersucht, da in vorhergehenden Studien ein deutlicher Zusammenhang zwischen Grad der Malignität und ADAMTS-13-Aktivität gefunden wurde [Oleksovicz et al. 1999; Koo et al. 2002].

Oleksovicz et al. [1999] untersuchten 35 Patienten mit diversen, malignen Erkrankungen (u.a. Patienten mit Tumoren/Metastasen in Prostata, Niere, Brust und Leber). Die Autoren fanden bei allen Patienten mit disseminierten Tumoren eine hochgradig reduzierte ADAMTS-13-Aktivität ($\leq 15\%$), während alle Patienten mit lokalen Tumoren eine normale ADAMTS-13-Aktivität ($\geq 88\%$) aufwiesen. Oleksovicz et al. [1999] vermuteten bei Patienten mit metastasierenden Tumoren eine ADAMTS-13 bedingte Anreicherung hochmolekularer VWF-Multimere (HMW-VWF). Die HMW-VWF-Multimere könnten eine gesteigerte Adhäsion zirkulierender Tumorzellen mit Thrombozyten und dem Endothel vermitteln, was wiederum die Entstehung von Tumorkolonien begünstigen könnte.

Koo et al. [2002] fanden ebenfalls eine enge Korrelation zwischen dem Grad der Malignität und der ADAMTS-13-Aktivität. Die Autoren fanden bei 15 Patienten mit fortgeschrittenem Darmkrebs (WHO-Grad IV) und diversen anderen malignen Erkrankungen (u.a. akute und chronische myeloische Leukämie, Brust- und Darmtumore) messbare, aber deutlich reduzierte ADAMTS-13-Aktivitäten zwischen 6 und 40%. 15 Patienten mit Darmkrebs WHO-Grad II und Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankung in kompletter oder partieller Remission (Non-Hodgin-Lymphom, myeloische Leukämie, Magen- und Thymustumore) demonstrierten dagegen eine normale ADAMTS-13-Aktivität von >50%.

Fontana et al. [2001] untersuchten 4 Patienten mit metastasierenden Tumoren und einer assoziierten thrombotischen Mikroangiopathie und fanden 2 Patienten mit moderat erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität (35%) und 2 Patienten mit normaler ADAMTS-13-Aktivität von 57 und 84%.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv demonstrierten 17/80 Patienten (21%) eine moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität zwischen 13 und 59%. Unter den Patienten mit malignen Hirntumoren findet sich im Vergleich zu den Patienten mit benignen Hirntumoren ein erhöhter Anteil von Patienten mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität (20% versus 6,6%). Vergleicht man die Absolutwerte der ADAMTS-13-Aktivität, ergibt sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei den Patienten mit Prostatatumoren ergibt sich ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Grad der Malignität und der ADAMTS-13-Aktivität. Zusammenfassend findet sich in der vorliegenden Studie demnach weder bei Patienten mit lokal begrenzten Tumoren (Patienten mit den verschiedenen Hirntumoren mit Ausnahme der 14 Patienten mit intracerebralen Metastasen) noch bei Patienten mit dissemierten, metastasierenden Tumoren (Patienten mit Prostatatumoren und intracerebralen Metastasen) ein Zusammenhang zwischen Malignität und ADAMTS-13-Aktivität.

Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den beschriebenen Resultaten von Oleksovicz et al. [1999] und Koo et al. [2002], bestätigen allerdings eine kürzlich veröffentlichte Studie von Mannucci et al. [2003a]. Mannucci et al. [2003a] fanden bei 23/49 Patienten (47%) mit diversen malignen Erkrankungen eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität zwischen 18 und 50%. Die Patienten mit metastasierenden Tumoren zeigten im Mittel eine niedrigere ADAMTS-13-Aktivität als die Patienten mit lokalen Tumoren. Dieser Unterschied ist jedoch, wie bei der hier durchgeführten Studie, statistisch nicht signifikant.

Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Studien lässt sich am ehesten durch die unterschiedlichen Patientenkollektive und die damit einhergehende Variabilität an untersuchten Tumortypen erklären. Maligne Erkrankungen lassen sich aufgrund der heterogenen Genese und Verbreitung nur sehr ungenügend zusammenfassen. Vorteilhaft bei der hier durchgeführten Studie ist der Vergleich von Patienten mit Tumoren gleicher Herkunft. Bei den Studien von Oleksovicz et al. [1999] und von Mannucci et al. [2003a]

werden demgegenüber Patienten mit Tumoren unterschiedlichster Herkunft miteinander verglichen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass kein genereller, d.h. für alle Tumortypen zutreffender Zusammenhang zwischen Grad der Malignität und ADAMTS-13-Aktivität besteht. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass bei einzelnen Tumortypen eine Assoziation zwischen ADAMTS-13-Aktivität und Ausbreitung des Tumors besteht. Stringente Studien mit engen Ausschlusskriterien sollten durchgeführt werden, um zu klären, ob es sich bei dem von Oleksovicz et al. [1999] und Koo et al. [2002] gefundenen Zusammenhang um eine primär-kausale Korrelation handelt. Um eine sekundäre Reduktion der ADAMTS-13-Aktivität durch die verschiedenen Krankheits-Komplikationen (Kap. 4.3.) auszuschließen, sollten in solchen Studien keine Patienten mit Leberzirrhose, Sepsis, renaler Insuffizienz, akuten thromboembolischen Ereignissen, DIC, thrombotischen Mikroangiopathien etc. untersucht werden.

Übereinstimmend fanden sich im Vergleich zu gesunden Probanden bei allen Studien Tumor-Patienten mit erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität. Eine grundsätzliche Beteiligung von ADAMTS-13 am Krankheitsgeschehen maligner Erkrankungen ist demzufolge wahrscheinlich. Prospektive Studien, z.B. über den Zusammenhang zwischen der ADAMTS-13-Aktivität bei Erstdiagnose und dem Krankheitsverlauf sollten eine mögliche pathophysiologische Relevanz der ADAMTS-13-Aktivität bei malignen Erkrankungen aufdecken. Ob eine reduzierte ADAMTS-13-Aktivität tatsächlich den Anteil hochmolekularer VWF-Multimere erhöht, welche wiederum die Formation von Tumorkolonien durch eine VWF-vermittelte Interaktion von Thrombozyten mit Tumor- und Endothelzellen begünstigt, ist letztlich nur in Tierversuchen zu klären.

Im Gegensatz zur ADAMTS-13-Aktivität findet sich bei dem VWF ein klarer Zusammenhang zwischen dem Grad der Malignität und dem VWF:Ag Spiegel. Im Vergleich zu den Kontrollen findet sich bei Patienten mit malignen Hirntumoren und metastasierenden Prostatatumoren signifikant erhöhte VWF:Ag Spiegel ($p=0,005$ und $p=0,0001$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test), während die Patienten mit benignen Hirntumoren und lokalen Prostatatumoren keine signifikante Erhöhung des VWF:Antigens aufweisen. Es ergibt sich für die Patienten mit Hirntumoren ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit malignen und benignen Tumoren ($p=0,018$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Zwischen den Patienten mit metastasierenden und lokalen Prostatatumoren zeigt sich hingegen kein signifikanter Unterschied im VWF:Ag. Dies liegt entweder in der geringen Fallzahl ($n=20$) begründet, oder in der Tatsache, dass hier nicht Patienten mit benignen und malignen Tumoren, sondern Patienten mit lokal-malignen und metastasierenden Tumoren miteinander verglichen wurden. Eine Assoziation zwischen erhöhtem VWF:Ag und dem Grad der Malignität wurde bereits bei Patienten mit Tumoren in Kopf und Nacken [Sweeney et al. 1990], bei Patienten mit Mammakarzinomen [Rohsig et al. 2001] und bei Patienten mit Darmtumoren [Damin et al. 2002] beschrieben. Die Ursache und Wirkung der erhöhten VWF:Ag Spiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen ist bislang nicht eingehend

untersucht worden. Man vermutet, dass eine Tumor-induzierte Proliferation des Endothels die Erhöhung des VWF:Antigens verursachen könnte.

Im Gegensatz zu den Studien von Mannucci et al. [2001] und Reiter et al. [2003] findet sich in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den Patienten mit malignen Erkrankungen als auch bei den Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen (Kap. 4.5.) keine Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag. Die fehlende Übereinstimmung zwischen der vorliegenden Arbeit und den publizierten Studien ist wahrscheinlich durch die verschiedenen Studienkollektive begründet. In der Studie von Mannucci et al. [2001] wurden Patienten mit verschiedenen Erkrankungen untersucht, welche nicht nur mit einer Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität, sondern auch mit einer Erhöhung des VWF:Antigens, einhergehen und in der Studie von Reiter et al. [2003] bezieht sich die Korrelation auf die Desmopressin bedingte Freisetzung des Von Willebrand Faktors und der damit assoziierten Reduktion der ADAMTS-13-Aktivität (Kap. 4.3.). Die von Mannucci et al. [2001] und Reiter et al. [2003] beschriebenen Korrelationen ($r=-0,4$ und $r=-0,67$) belegen demzufolge keinesfalls einen direkten und kausalen Zusammenhang zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag.

Der Zusammenhang zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag sollte in weiteren Studien, insbesondere mit gesunden Personen, untersucht werden. Dabei ist darauf zu achten, dass gesunde Probanden wie Patienten Blutgruppenspezifisch analysiert werden, da die Blutgruppe nachweislich die Zugänglichkeit des Von Willebrand Faktors für die ADAMTS-13 katalysierte Proteolyse determiniert [Bowen 2003]. Sollte sich die beschriebene Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität und dem VWF:Ag in solchen Studien bestätigen, könnte man eine Beteiligung von ADAMTS-13 an dem Clearance des Von Willebrand Faktors vermuten.

Im Gegensatz zu der fehlenden Korrelation zwischen der ADAMTS-13-Aktivität dem VWF:Ag ergibt sich sowohl bei den Patienten mit malignen Erkrankungen als auch bei den Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen (Kap. 4.5.) für die ADAMTS-13-Aktivität eine deutlich signifikante Altersabhängigkeit. Die ADAMTS-13-Aktivität sinkt bei steigendem Alter mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=-0,29$ bis $-0,33$ (Spearman-Rang-Korrelation). Da sich bei der Analyse der einzelnen Patientenkollektive der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem Alter bestätigt, kann man davon ausgehen, dass diese Altersabhängigkeit nicht krankheitsspezifisch ist. Bei einem Korrelationskoeffizienten von $r=-0,3$ wird die Variabilität der ADAMTS-13-Aktivität zu 60% ($r^2 \times 100$) vom Alter bestimmt. Die Altersabhängigkeit der ADAMTS-13-Aktivität muss in Studien berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Patientenkollektive bei der vorliegenden Arbeit stets mit einem altersangepasstem Normalkollektiv verglichen.

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden im Jahr 2003 in Thrombosis Research publiziert [Böhm et al. 2003d].

4.5. ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen

Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und venösen Thrombosen erfolgte, um zu untersuchen, ob ein vorliegender ADAMTS-13-Mangel das Auftreten von thromboembolischen Erkrankungen, insbesondere an Orten hoher Scherkräfte, begünstigt. Dazu wurde eine umfangreiches Patientenkollektiv mit ischämischen Schlaganfällen und venösen Thrombosen (tiefe Beinvenenthrombosen und Augenvenenthrombosen) untersucht. Alle Patienten wurden in klinischer Remission und in Abwesenheit akuter Infektionen getestet, um eine mögliche Akut-Phasen-bedingte Veränderung der ADAMTS-13-Aktivität (Kap. 4.3.) zu vermeiden. Um eine Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität durch eine Lebersynthesestörung, eine Nierenfunktionsstörung oder eine Schwangerschaft [Mannucci et al. 2001] auszuschließen, wurden Patienten mit Leberzirrhose und renaler Insuffizienz sowie schwangere Frauen ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Des weiteren wurden aus naheliegenden Gründen (Kap. 4.2.) keine Patienten mit TTP in das Studienkollektiv aufgenommen.

2/70 Patienten (2,8%) mit ischämischen Schlaganfällen und 1/70 Patient (1,4%) mit einer tiefen Beinvenenthrombose zeigten, im Vergleich zu dem alters- und geschlechtsangepasstem Normkollektiv, einen milden ADAMTS-13-Mangel. Bei einer derartig niedrigen Prävalenz ist der ADAMTS-13-Mangel statistisch kein signifikanter Risikofaktor für das Auftreten von ischämischen Schlaganfällen oder venösen Thrombosen. Vergleicht man die Absolutwerte für die ADAMTS-13-Aktivität ergibt sich für die Patienten mit ischämischen Schlaganfällen kein signifikanter Unterschied in der ADAMTS-13-Aktivität zu den Patienten mit venösen Thrombosen und dem Kontrollkollektiv ($p > 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Patienten mit venösen Thrombosen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe überraschenderweise eine schwach signifikante Erhöhung der ADAMTS-13-Aktivität ($p = 0,03$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test). Dieses Ergebnis müsste in Studien mit einer größeren Anzahl von Patienten und Kontrollen bestätigt werden, um dem statistischem Befund bei der hohen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,03$ eine biologische Bedeutung zuzumessen. Theoretisch würde eine gesteigerte ADAMTS-13-Aktivität vielmehr eine Blutungs- als eine Thromboseneigung verursachen. Das Vorkommen einer erhöhten ADAMTS-13-Aktivität ist, wie bereits im Kapitel 4.1. ausgeführt, bislang noch nicht untersucht worden. Eine reaktiv erhöhte Transkriptionsrate von ADAMTS13 unter bestimmten Bedingungen wie z.B. bei einer dauerhaft gesteigerten Freisetzung von VWF wäre durchaus denkbar.

Im Gegensatz zur ADAMTS-13-Aktivität findet sich in der vorliegenden Studie ein signifikant erhöhtes VWF:Ag sowohl bei Patienten mit arteriellen als auch mit venösen Thrombosen. Verschiedene retrospektive Studien fanden bei Patienten mit ischämischen Schlaganfällen ebenfalls ein signifikant erhöhtes VWF:Ag und charakterisierten einen erhöhten VWF:Ag Spiegel als potentiellen Risikofaktor für arterielle Thrombosen [Jastrzebska et al. 2002; Qizilbash et al. 1997]. Folsom et al. [1999] konnten in einer großen, prospektiven Studie diese Vermutung bestätigen, während Johansson et al. [2002] in einer

weiteren prospektiven Studie keine positive Assoziation zwischen erhöhtem VWF:Ag und ischämischen Schlaganfällen fanden. Bei Patienten mit venösen Thrombosen fand sich sowohl in verschiedenen retrospektiven Studien [Bombeli et al. 2002; Koster et al. 1995] als auch in einer prospektiven Studie [Tsai AW et al. 2002] eine signifikante Erhöhung des VWF:Ag-Spiegels. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Großteil der in Literatur dokumentierten Studien. Nichtsdestotrotz können zu diesem Zeitpunkt noch keine zweifelsfreien Rückschlüsse über die Bedeutung des Von Willebrand Faktors als Risikofaktor für venöse und arterielle Thrombosen gezogen werden. Der Zusammenhang zwischen erhöhtem VWF:Ag und thromboembolischen Erkrankungen sollte in großen, prospektiven Studien validiert werden. In solchen Studien müssten Patienten mit Grunderkrankungen, welche nachweislich mit einer erhöhten VWF-Freisetzung einhergehen, wie z.B. maligne Erkrankungen, chronische Infektionen oder vaskuläre Erkrankungen ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung des VWF:Antigens hauptsächlich durchgeführt, um einen Vergleichsparameter zu bestimmen und um eine mögliche Korrelation zwischen VWF:Ag und ADAMTS-13-Aktivität zu untersuchen. Bei den Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen und dem entsprechendem Normalkollektiv III findet sich, wie bei den Patienten mit malignen Erkrankungen, keine Korrelation zwischen dem VWF:Ag und der ADAMTS-13-Aktivität. Dies steht im Gegensatz zu den Studien von Mannucci et al. [2001] und Reiter et al. [2003] und wurde bereits im Kapitel 4.3. ausführlich diskutiert.

Die Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen zeigten wie die Patienten mit malignen Erkrankungen und die untersuchten Normalkollektive eine signifikante und umgekehrte Korrelation zwischen ADAMTS-13-Aktivität und dem Lebensalter der getesteten Individuen. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls bereits im Kapitel 4.3. hinreichend diskutiert.

Obwohl sich statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer reduzierten ADAMTS-13-Aktivität und dem Auftreten thromboembolischer Erkrankungen ergibt, ist der gefundene milde ADAMTS-13-Mangel bei den 2 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und dem Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose eine bemerkenswerter Befund. Der ADAMTS-13-Mangel wurde bei den betreffenden Patienten in einer zweiten Blutentnahme bestätigt, d.h. man kann einen vorübergehende Erniedrigung z.B. durch eine asymptomatische Infektion ausschließen. Da bei den Patienten keine inhibitorische Aktivität gegen ADAMTS-13 detektiert werden konnte, ergibt sich grundsätzlich der Verdacht auf einen hereditären ADAMTS-13-Mangel.

Um dies zu untersuchen, wurde zunächst die Patientin S.W. mit einer außerordentlich niedrigen ADAMTS-13-Aktivität von 17% für die sehr zeit- und geldaufwendige ADAMTS13-Mutationsanalyse ausgewählt. Die Sequenzierung der 29 Exons von ADAMTS13 offenbarte 4 homozygote Missensemutationen in den Exons 1 (7 R→W); 12 (448 Q→E); 16 (618 P→A) und 18 (732 A→V) und eine heterozygote Missensemutation in Exon 9 (353 P→L). Die Mutationen in den Exons 1; 12; 16 und 18 wurden von Levy et al.

[2001] und z.T. von Antoine et al. [2003] als SNPs identifiziert. Die 353 P→L Mutation im Exon 9 wurde von Schneppenheim et al. [2003b] und Assink et al. [2003] bei insgesamt 3 Patienten mit TTP beschrieben. Die von Schneppenheim et al. [2003b] und Assink et al. [2003] untersuchten Patienten mit TTP sind „compound“ heterozygot für die 353 P→L Mutation und jeweils einer zusätzlichen Missense-, Nonsense- und Rasterschub-Mutation. Bemerkenswerterweise wurde die hier gefundene Kombination der 4 SNPs im Exon 1, 12, 16 und 18 kürzlich bei einer Familie mit hereditärer TTP identifiziert [Antoine et al. 2003]. Die dort untersuchten Brüder tragen bei hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität die entsprechenden SNPs kombiniert mit einer Missense-Mutation im Exon 28 (1336 R→W) auf ihrem mütterlichen Allel. Auf ihrem väterlichen Allel tragen beide Patienten eine Stopp-Mutation im Exon 2.

Die entsprechenden SNPs und die 353 P→L Mutation im Exon 9 wurden bei dem Sohn der Patientin (S.J.) ebenfalls nachgewiesen. Der Sohn S.J. unterscheidet sich von seiner Mutter nur durch das Fehlen der 7 R→W; 618 P→A und 732 A→V-SNPs auf seinem zweiten Allel. Dabei demonstriert der Sohn S.J. eine weitaus höhere ADAMTS-13-Aktivität als seine Mutter (56% vs 17%). Daraus lässt sich vermuten, dass die Kombination der SNPs für die Erniedrigung der ADAMTS-13-Aktivität im Plasma von S.W. mitverantwortlich sind. Die Erniedrigung durch einen einzelnen SNP ist sehr unwahrscheinlich, da bislang keine weit verbreiteter ADAMTS-13-Mangel in der Normalbevölkerung gefunden wurde.

Um nachzuweisen, ob und wie der ADAMTS13-Genotyp der Patientin S.W. tatsächlich den gefundenen milden ADAMTS-13-Mangel verursacht, werden zur Zeit die 353 P→L Mutation bzw. die entsprechenden SNPs singulär und in Kombination miteinander von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Scheiflinger (Baxter BioScience, Orth, Österreich) in HEK 293 Zellen exprimiert. Erste vorläufige Ergebnisse zeigen, dass die Kombination der 4 identifizierten SNPs mit der 353 P→L Mutation die Sekretion auf ca. 1% des Wildtypes erniedrigt (Plaimauer und Scheiflinger 2003, persönliche und mündliche Mitteilung).

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass SNPs, welche singulär keinen messbaren Einfluss auf die ADAMTS-13-Aktivität haben, in Kombination die Enzymaktivität im Plasma signifikant erniedrigen können. Bestetti et al. [2003] fanden ebenfalls, allerdings ohne den Nachweis einer in-vitro Expression, dass eine neu beschriebene Mutation im Exon 3 (88 V→M) nur in Kombination mit dem 448 Q→E-SNP (jeweils heterozygot) die ADAMTS-13-Aktivität im Plasma hochgradig erniedrigen kann. Zudem fanden Bestetti et al. [2003], dass der 7 R→W-SNP im Exon 1 den Effekt der kombinierten 88 V→M /448 Q→E-Mutationen kompensieren kann. Bei dem entsprechenden Familienmitglied zeigte sich eine ADAMTS-13-Aktivität von 50%, während das Familienmitglied mit der 88 V→M-Mutation und des 448 Q→E-SNP ohne den 7 R→W-SNP eine ADAMTS-13-Aktivität von 7% aufweist. Diese Vermutungen müssen durch in-vitro Expressionsstudien verifiziert werden. Die Befunde der Patientin S.W. und die Beobachtungen von Bestetti et al. [2003] zeigen allerdings die

komplizierten Mechanismen, mit welchen unter Beteiligung der verschiedenen Protein- bzw. Gen-Domänen die ADAMTS-13-Aktivität im Plasma beeinflusst bzw. reguliert wird.

Zusammenfassend wurde durch die vorliegende Arbeit erstmalig ein milder, congenitaler ADAMTS-13-Mangel bei einer Familie ohne TTP identifiziert. Inwieweit der ADAMTS-13-Mangel bei der Patientin S.W. für ihre rezidivierenden, ischämischen Schlaganfälle verantwortlich oder mitverantwortlich ist, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entscheiden. Bemerkenswerterweise offenbarte die eingehende Familienanamnese bei der Patientin rezidivierende Schlaganfälle bei der Mutter der Patientin. Zudem sei die Schwester der Patientin mit 57 Jahren an einem nicht näher zu charakterisierenden „Hirnschlag“ verstorben. 3 weitere Geschwister der Patientin hatten bislang keine Schlaganfälle oder andere thromboembolische Erkrankungen. Die Patientin S.W. war trotz der positiven Familienanamnese im routinemäßigem Thrombophilie Screening unauffällig (negativ für FV-R506G- und FII-20210A→G-Mutation, kein Nachweis von Lupusantikoagulantien oder Anti-Cardiolipin-Antikörpern, normale PS-, PC- und FVIII-Aktivität). Der erste Schlaganfall bei der Patientin S.W. trat im Alter von 34 Jahren unter Einnahme von Ovulationshemmern und Nikotinabusus auf. Bei dem zweiten Schlaganfall im Alter von 46 Jahren wurde eine arterielle Hypertonie diagnostiziert. Die letztgenannten Risikofaktoren könnten das Auftreten der Schlaganfälle begünstigt haben. Grundsätzlich lässt sich bei der Patientin S.W. jedoch eine Beteiligung des hereditären ADAMTS-13-Mangels an der Genese des Schlaganfalles vermuten. Ob der milde (hereditäre) ADAMTS-13-Mangel als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von arteriellen Thrombosen charakterisiert werden kann ist unklar. Dazu sollte eine großes Kollektiv von Patienten mit juvenilen Schlaganfällen, bestenfalls mit positiver Familienanamnese und unauffälligem Thrombophilie-Screening, untersucht werden.

Ein Teil der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden im letzten Jahr bereits in Form von Abstracts veröffentlicht [Böhm et al. 2003a+g].

5. Zusammenfassung

Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) ist ein schweres, heterogenes Syndrom, bei welchem es zu einer lebensbedrohlichen, disseminierten Mikrothrombosierung in den arteriellen Kapillaren kommt. Bei Patienten mit TTP wurde 1997 erstmalig ein Mangel an der Von Willebrand Faktor (VWF)-spaltenden Protease entdeckt. Diese Protease wurde 2001 als ein neues Mitglied der „**a** disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs“-Familie identifiziert und als ADAMTS-13 bezeichnet. Der ADAMTS-13-Mangel soll eine Anreicherung großer VWF-Multimere verursachen, welche für die pathologische Thrombenbildung bei Patienten mit TTP verantwortlich gemacht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität entwickelt. Mittels des neuen Verfahrens wurde die Bedeutung von ADAMTS-13 in der Pathophysiologie der erworbenen TTP und in der Genese anderer Erkrankungen untersucht.

Bei der hier entwickelten Methode wird eine beliebige Testprobe mit einem ADAMTS-13-freien VWF-Substrat versetzt und nach entsprechender Inkubation die ADAMTS-13-Aktivität ermittelt, indem der Abfall der VWF-vermittelten Aggregation von Thrombozyten gemessen wird. Das neuartige Verfahren zeigt eine gute Reproduzierbarkeit und wurde durch extensiven Vergleich mit der herkömmlichen Immunoblotting-Methode validiert. Zudem wurde die Richtigkeit der Methode durch erfolgreiche Teilnahme an einer internationalen Multicenterstudie bestätigt. Die neue Methode ist im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren im klinisch-diagnostischen Routinelabor anwendbar, da das Verfahren auf der Verwendung eines routineerprobten, automatisierten Testes zur Bestimmung der VWF:Ristocetin-Kofaktor-Aktivität beruht. Der Test ist bei hohem Probendurchsatz schnell und einfach durchführbar und benötigt keine spezielle Laborausrüstung oder besondere Expertise.

In den untersuchten Patientenkollektiven war der schwere ADAMTS-13-Mangel mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 89% mit einer akuten TTP korreliert. Bei 85% der Plasmaproben mit hochgradig erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität konnte in vitro eine inhibitorische Aktivität gegen ADAMTS-13 detektiert werden. Die Plasmapherese-Therapie (PP-Therapie) führte in 75% der untersuchten TTP-Episoden zu einer letztendlichen Eliminierung des Inhibitors mit einer korrespondierenden Erhöhung der ADAMTS-13-Aktivität. Der Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität war in diesen Fällen eng mit dem Anstieg der Thrombozyten korreliert. In 15% der untersuchten Episoden führte die PP-Therapie zu einer Erniedrigung des Inhibitortiters ohne messbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität. Bei 10% der untersuchten Episoden kam es unter PP-Therapie zu einem permanenten Anstieg des Inhibitortiters. Trotz fehlender Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität in den letztgenannten Fällen induzierte die PP-Therapie eine klinische Remission. Zwei Patienten zeigten nach Splenektomie bzw. Rituximab-Gabe ohne nachweisbare Rekonstitution der ADAMTS-13-Aktivität ebenfalls eine konsistente, klinische Remission. Die Ergebnisse zeigen, dass die in vitro gemessene ADAMTS-13-Aktivität die

pathophysiologisch wirksamen Prozesse der akuten TTP nicht immer eindeutig erklären. Dies weist auf bislang unentdeckte pathogene Mechanismen hin. Zudem könnten die derzeit gängigen Methoden zur Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität (einschließlich des hier entwickelten Verfahrens) die tatsächliche in vivo VWF-Proteolyse durch ADAMTS-13 nicht ausreichend widerspiegeln. Die Ergebnisse zeigen, dass ein in vitro detektierter, schwerer ADAMTS-13 Mangel nicht ausreicht, um eine akute TTP-Episode auszulösen. Die Untersuchungen über den klinischen Langzeitverlauf und der ADAMTS-13-Aktivität in Remission zeigte vielmehr, dass der ADAMTS-13-Mangel als ein Risikofaktor für die akute TTP betrachtet werden sollte.

Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität bei den unterschiedlichsten hämatologischen Erkrankungen offenbarte eine moderat erniedrigte ADAMTS-13-Aktivität in einer Vielzahl von schweren, zumeist intensivpflichtigen Erkrankungen. Bei einigen Patienten konnte nachgewiesen werden, dass sich die ADAMTS-13-Aktivität in Remission normalisiert. Daraus lässt sich möglicherweise vermuten, dass sich die ADAMTS-13-Aktivität generell bei einer Akut-Phasen-Reaktion erniedrigt.

Die Untersuchungen der ADAMTS-13-Aktivität bei Patienten mit malignen Erkrankungen zeigte bei 21% der getesteten Patienten einen milden ADAMTS-13 Mangel. Bei den untersuchten Patienten mit Hirn- und Prostatatumoren konnte, im Gegensatz zu vorhergehenden Studien mit anderen Tumortypen, keine Korrelation zwischen erniedrigter ADAMTS-13-Aktivität und dem Grad der Malignität bzw. der Dissemination des Tumors gefunden werden.

Die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität bei einem umfangreichen Patientenkollektiv mit thromboembolischen Erkrankungen zeigte, dass der ADAMTS-13 Mangel kein häufig vorkommender Risikofaktor für das Auftreten von arteriellen oder venösen Thrombosen darstellt. In der vorliegenden Studie wurde jedoch der weltweit erste Fall eines milden, congenitalen ADAMTS-13 Mangels bei einer Patientin mit familiären, rezidivierenden, ischämischen Schlaganfällen gefunden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 entwickelt, welchem durch seine klinische Anwendbarkeit in Zukunft eine weitreichende Bedeutung zufallen könnte. Die klinischen Studien dieser Arbeit belegen zum einen den Zusammenhang zwischen ADAMTS-13 und TTP und weisen zum anderen auf andere bislang nicht identifizierte Mechanismen hin, welche das klinische Bild der TTP determinieren. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADAMTS-13 neben einer Beteiligung an der Akut-Phasen-Reaktion, eine möglicherweise sehr bedeutsame Rolle bei malignen und thromboembolischen Erkrankungen spielt. Dies sollte in zukünftigen Studien, insbesondere im Hinblick auf neuartige therapeutische Möglichkeiten durch die Gabe von ADAMTS-13, näher untersucht werden.

6. Literatur

Ahmad A, Aggarwal A, Daya S, Kinsella V, Dave HP, Schechter GP, Rick ME. Rituximab for the treatment of relapsing/refractory thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Blood* 2002; 100: Abstract 2703

Ajzenberg N, Denis CV, Veyradier A, Girma JP, Meyer D, Baruch D. Complete defect in VWF-cleaving protease activity associated with increased shear-induced platelet aggregation in thrombotic microangiopathy. *Thromb Haemost* 2002; 87: 808-811

Allford SL, Harrison P, Lawrie AS, Liesner R, Mackie IJ, Machin SJ. Von Willebrand factor-cleaving protease activity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2000; 111: 1215-1222

Allford SL, Machin SJ. Current understanding of the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Pathol* 2000; 53: 497-501

Amar S, Rice L, Dong JF, Chow T, Nolasco L, Bernado A, Baker KR, Moake JL. Evaluation of ADAMTS-13 Von Willebrand factor-Cleaving Metalloprotease activity using a rapid Endothelial cell surface-based assay in two chronic relapsing TTP patients receiving plasma infusion. *Blood* 2002; 100 (11): Abstract 2698

Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura, report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 1966; 45: 139-146

Anstadt MP, Carwile JM, Guill CK, Conklin LD, Soltero ER, Lucci A, Kroll MH. Relapse of thrombotic thrombocytopenic purpura associated with decreased VWF cleaving activity. *Am J Med Sci* 2002; 323: 281-284

Antoine G, Zimmermann K, Plaimauer B, Grillowitz M, Studt JD, Lämmle B, Scheiflinger F. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of Von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. *Brit J Haematol* 2003, 120: 821-824

Arai S, Allan C, Streiff M, Hutchins GM, Vogelsang GB, Tsai HM. Von Willebrand factor-cleaving protease activity and proteolysis of Von Willebrand factor in bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Hematol J* 2001; 2: 292-299

Aronson DL, Krizek DM, Rick ME. A rapid assay for the VWF Protease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 184-185

Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, López JA. Ultralarge multimers of Von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* 2002; 99: 3971-3977

Asada Y, Sumiyoshi A. Pathological features of thrombotic thrombocytopenic purpura. In: Kaplan BS, Trompeter RS, Moake JL (eds). *Hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Marcel Dekker Inc, New York, 1992; 491-497

Assink K, Schiphorst R, Allford S, Karpman D, Etzioni A, Brichard B, Van de Kar N, Monnens L, Van den Heuvel L. Mutation analysis and clinical implications of Von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int* 2003; 63: 1995-1999

Aster RH. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) – an enigmatic disease finally resolved? *Trends Mol Med* 2002; 8: 1-3

- Barbot J, Costa E, Guerra M, Barreirinho MS, Isvarlal P, Robles R, Gerritsen HE, Lämmle B, Furlan M. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of Von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol* 2001; 113: 649-651
- Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med* 1991; 325: 398-403
- Bestetti G, Stellari A, Lattuada A, Corbellino M, Parravicini C, Calzarossa C, Cenzuales S, Moroni M, Galli M, Rossi E. ADAMTS 13 genotype and VWF protease activity in an Italian family with TTP. *Thromb Haemost* 2003; 90: 955-956
- Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lämmle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002a; 100: 710-713
- Bianchi V, Zeerleder S, Kessler P, Robles R, Wuillemin W, Alberio L, Lämmle B. VWF-cleaving protease in severe sepsis and septic shock. *Ann Hematol* 2002b; 81 (Suppl.): Abstract 22
- Biecker E, Schwarze C, Ko YD, Sauerbruch T. Nierenversagen, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie bei einem 36-jährigen Patienten. *Internist* 2001; 42: 1031-1034
- Blood CT Res Foundation, Montgomery R, Raife T, Haberichter S, MCW Res Foundation Inc (Applicants). Synthetic and recombinant substrates for the detection of the Von Willebrand factor-cleaving protease. Requested Patent W00210437, Publikationsdatum 07.02.2002
- Blot E, Decaudin D, Veyradier A, Bardier A, Zagame OL, Pouillart P. Cancer-related thrombotic microangiopathy secondary to Von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Thromb Res* 2002; 106: 127-130
- Bobbio-Pallavicini E, Porta C, Centurioni R, Gugliotta L, Vianelle N, Tacconi F, Billio A, Ascari E. Vincristine sulfate for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura refractory to plasma exchange. *Eur J Hematol* 1994; 52: 222-226
- Böhm M, Antoine G, Plaimauer B, Krause M, Scheiflinger F, Scharrer I. Determination of ADAMTS-13 activity in patients with venous thrombosis and 70 patients with ischemic stroke revealed the first case of partial and congenital ADAMTS-13 deficiency as possible cause of ischemic stroke. *Blood* 2003a, 102 (11): Abstract 2975
- Böhm M, Bergmann L, Betz C, Scharrer I. The Effect of Plasma exchange therapy on Von Willebrand factor cleaving protease activity of ADAMTS13 and on autoantibody inhibitor levels in index episodes and relapses of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002a, 100 (11): Abstract 270
- Böhm M, Betz C, Krause M, Miesbach W, Bergmann L, Scharrer I. ADAMTS-13 activity and corresponding inhibitor titers during plasmaexchange therapy in 13 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *J Thromb Haemost* 2003b, 1 (Suppl. 1): Abstract 318
- Böhm M, Betz C, Stier-Brück I, Scharrer I. Early and rapid diagnosis of acute TTP by measuring activity of Von Willebrand factor cleaving metalloprotease (ADAMTS13): a case report. In: Scharrer I, Schramm W (eds): 32nd Hemophilia Symposium Hamburg 2001, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2002b
- Böhm M, Burchert A, Scharrer I. AB0 blood group influences the clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003c, 102 (11): Abstract 4497

- Böhm M, Gerlach R, Beecken WD, Scheuer T, Stier-Brück I, Scharrer I. ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis. *Thromb Res* 2003d; 111: 33-37
- Böhm M, Gerlach R, Beecken WD, Scheuer T, Stier-Brück I, Scharrer I. Malignancy and metastasis is not associated with decreased ADAMTS-13 activity in patients with brain tumors and prostate tumors. *J Thromb Haemost* 2003e; 1 (Suppl. 1): Abstract 1670
- Böhm M, Krause M, Vigh T, Scharrer I. Von Willebrand factor-cleaving protease activity in TTP using a new method based on the positive correlation between VWF multimeric size and Ristocetin Cofactor activity. *Blood* 2001; 98 (11), Abstract 130
- Böhm M, Miesbach W, Krause M, Vigh T, Scharrer I. Von Willebrand factor-cleaving protease in various thrombotic, hemolytic and autoimmune disorders. In: Scharrer I, Schramm W (eds): 33rd Hemophilia Symposium Hamburg 2002. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2003f
- Böhm M, Peyvandi F, Krause M, Miesbach W, von Auer C, Scharrer I. Mild ADAMTS-13 deficiency in patients with ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2003g; 1 (Suppl. 1): Abstract 990
- Böhm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of Von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol* 2002c; 81: 430-435
- Böhm M, Vigh T, Scharrer I. The significance of the VWF-cleaving protease in the pathogenesis of TTP. *Ann Hematol* 2002d; 81 (Suppl. 1): Abstract 29
- Bombeli T, Jutzi M, De Conno E, Seifert B, Fehr J. In patients with deep vein thrombosis elevated levels of factor VIII correlate only with Von Willebrand factor but not other endothelial cell-derived coagulation and fibrinolysis proteins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 557-581
- Bowen DJ. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of Von Willebrand factor by ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 33-40
- Brass L. VWF meets the ADAMTS family. *Nature Medicine* 2001; 7: 1177-1178
- Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital Von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28: 173-190
- Budde U, Pötzsch B. Von Willebrand Faktor und Von Willebrand-Erkrankung. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B. (ed.). *Hämostaseologie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1998
- Bukh A, Ingerslev J, Stenbjerg S, Hundahl Møller NP. The multimeric structure of plasma FVIII:Ag studied by electroelution and immunoperoxidase detection. *Thromb Res* 1986; 43: 579-584
- Byrnes JJ, Khurana M. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. *N Engl J Med* 1977; 297: 1386-1389
- Byrnes JJ, Lian EC. Recent therapeutic advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Thromb Haemost* 1979; 5: 199-215
- Cal S, Obya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otín C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002; 283: 49-62

- Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, Igarashi T, Tarr PI. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 23-32
- Chang JC, El-Tarabily M, Gupta S. Acute thrombotic thrombocytopenic purpura following abdominal surgeries: a report of three cases. *J Clin Apheresis* 2000; 15: 176-179
- Chemnitz J, Draube A, Scheid C, Staib P, Schulz A, Diehl V, Söhnngen D. Successful treatment of severe thrombotic thrombocytopenic purpura with the monoclonal antibody Rituximab. *Am J Hematol* 2002; 71: 105-108
- Chemnitz J, Draube A, Schulz A, Scheid C, Fuchs M, Diehl V, Söhnngen D. Rituximab in the treatment of severe thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Blood* 2001a; 98 (11): Abstract 131
- Chemnitz J, Schulz A, Diehl V, Söhnngen D. Thrombotisch-thrombozytopenische purpura (Moschcowitz-Syndrom). *Med Klin* 2001b; 96: 343-350
- Chung DW, Fujikawa K. Processing of Von Willebrand factor by ADAMTS-13. *Biochemistry* 2002; 41: 11065-11070
- Cines DB, Konkle BA, Furlan M. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a paradigm shift? *Thromb Haemost* 2000;84: 528-535
- Cuttner J. Splenectomy, steroids, and dextran 70 in thrombotic thrombocytopenic purpura. *JAMA* 1974; 227: 397-402
- Dade Behring Marburg GmbH Deutschland. Beipackzettel zum BC Von Willebrand-Reagenz. Ausgabe Mai 2001a
- Dade Behring Marburg GmbH, Deutschland (Anmelder). Patentnummer: DE 199 65109 A1, Publikationsdatum 05.07.2001b
- Damin DC, Rosito MA, Gus P, Roisemberg I, Bandinelli E, Schwartzmann G. Von Willebrand factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 42-45
- De Groot PG. The Role of Von Willebrand factor in platelet function. *Sem Thromb Hemost* 2002; 28: 133-138
- De la Rubia J, Garcia I, Jarque I, Arriaga F, Gomis F, Sanz MA. Splenectomy in patients with refractory or relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2000; 85: 440-441
- Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA Von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 6306-6310
- Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, López JA, Cruz MA. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large Von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2003; 278: 29633-29639
- Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade Aj, McIntire LV, Fujikawa K, López JA. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge Von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002; 100: 4033-4039
- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Güngör T, Krackhardt B, Kornhuber B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophilias. *Lancet* 1992; 339: 594-598

- Eknoyan G, Riggs SA. Renal involvement in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Nephrol* 1986; 6: 117-131
- Fariás C, Kempfer AC, Amaral MM, Woods AI, Nadal MV, Carballo GA, Meschengieser SS, Lazzari MA. Virtual decrease of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) after infusion of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003; 1 Suppl. 1 July: Abstract 1675
- Favaloro EJ, Smith J, Petinos P, Hertzberg H, Koutts J on behalf of the the RCPA quality Assurance Program (QAP) in Haematology Haemostasis Advisory Panel. Laboratory testing for Von Willebrand disease: an assessment of current diagnostic practice and efficacy by means of a multi-laboratory survey. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1276-1282
- Favaloro EJ. Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and sub-classification of Von Willebrand's disease. *Blood Reviews* 1999; 13: 185-204
- Ferrara F, Annunziata M, Ollio F, Palmieri S, Copia C, Mele G, Pocal B, Schiavone EM. Vincristine as treatment for recurrent episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2002; 81: 7-10
- Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ, Rasmussen ML, Wu KK for the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation* 1999; 100: 736-742
- Fontana S, Gerritsen HE, Kremer Hovinga J, Furlan M, Lämmle B. Microangiopathic haemolytic anaemia in metastasizing malignant tumours is not associated with a severe deficiency of the Von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol* 2001; 113:100-102
- Forman RB, Benkel SA, Novik Y, Tsai HM. Presence of ADAMTS13 activity in a patient with metastatic cancer and thrombotic microangiopathy. *Acta Haematol* 2003; 109: 150-152
- Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human Von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001; 98: 1662-1666
- Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. Von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *Int J Hematol* 2002; 75: 25-34
- Fujimura Y. Is Upshaw-Schulman syndrome congenital thrombotic thrombocytopenic purpura or hemolytic-uremic syndrome? Yes to both. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2457-2458
- Furlan M, Lämmle B. Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of Von Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14. 437-454
- Furlan M, Lämmle B. Assays of Von Willebrand factor-cleaving protease: a test for diagnosis of familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Sem Thromb Hemost* 2002; 28: 167-172
- Furlan M, Lämmle B. Von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1999; 82: 592-600
- Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lämmle B. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic Syndrome. *N Engl J Med* 1998a; 339: 1578-1584
- Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterisation of a protease from human plasma cleaving Von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996; 10: 4223-4234

- Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lämmle B. Recovery and half-life of Von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1999; 81: 8-13
- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lämmle B. Acquired deficiency of Von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998b; 91: 2836-2846
- Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lämmle B. Deficient activity of Von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1997; 89: 3097-3103
- Furlan M. Severe deficiency of ADAMTS-13 is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003; DOI: 10.1046/j.1538-7933.2003.00380
- Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol* 1996; 72: 341-348
- Gaddis TG, Guthrie TH, Drew MJ. Treatment of plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with protein A immunoabsorption. *Am J Hematol* 1997; 55: 55-58
- Galbusera M, Noris M, Rossi C, Orisio S, Caprioli J, Buggeri ZM, Amadei B, Ruggenenti P, Vasile B, Casari G and Remuzzi G on behalf of the Italian Registry of familial and recurrent HUS/TTP. Increased fragmentation of Von Willebrand factor, due to abnormal cleavage of the subunit, parallels disease activity in recurrent hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and discloses predisposition in families. *Blood* 1999; 2: 610-620
- Gangarosa EJ, Johnson TR, Ramos HS. Ristocetin-induced thrombocytopenia; site and mechanism of action. *Arch Intern Med* 1960; 105: 83-89
- George JN, Vesely SK. Severe deficiency of ADAMTS-13 is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003; DOI: 10.1046/j.1538-7933.2003.00379.x.
- George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic syndrome. *Blood* 2000; 96: 1223-1229
- Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified Von Willebrand factor-cleaving protease *Blood* 2001; 98: 1654-1661
- Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lämmle B, Furlan M. Assay of Von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease based in decreased Collagen binding activity of degraded VWF. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1386-1389
- Gerth J, Busch M, Ott U, Gröne HJ, Haufe CC, Fünfstück R, Sperschneider H, Stein G. Schwangerschaftsassozierte thrombotische Mikroangiopathie – eine diagnostische und therapeutische Herausforderung. *Med Klin* 2002; 97: 547-552
- Ginsburg D. Molecular Genetics of Von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 585-591
- Gutterman LA, Kloster B, Tsai HM. Rituximab therapy for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28: 385-391
- Guttermann LA. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome: the role of vincristine. In: Kaplan BS, Trompeter RS, Moake JL (eds). Hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Marcel Dekker Inc, New York, 1992; 513-497-529

- Häberle J, Kehrel B, Ritter J, Jürgens H, Lämmle B, Furlan M. New strategies in diagnosis and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura: case report and review. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 883-887
- Hayward CP, Sutton DM, Carter WH Jr, Campbell ED, Scott JG, Frankcombe WH, Shumak KH, Baker MA. Treatment outcomes in patients with adult thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Arch Intern Med* 1994; 154: 982-987
- He S, Cao H, Magnusson CGM, Eriksson-Berg M, Mehrkash M, Schenck-Gustafsson K, Blombäck M. Are increased levels of Von Willebrand factor in Chronic Coronary Heart Disease caused by decrease in Von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an Immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the Von Willebrand factor protein. *Thromb Res* 2001; 103: 241-248
- Hiller E, Riess H. *Hämorrhagische Diathese und Thrombose*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998
- Horton TM, Stone JD, Yee D, Dreyer Z, Moake JL, Mahoney DH. Case Series of thrombotic thrombocytopenic purpura in children and adolescents. *J of Ped Hematol* 2003; 25: 336-339
- Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 834-839
- Howard MA, Firkin BG. Ristocetin-a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 1971; 26: 362-369
- Hulstein JJJ, Rison C, Hene R, De Groot F, Romijin R, Fijnheer R. The sensitivity and specificity of ADAMTS13 activity for primary thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003; 1 Suppl. 1 July: Abstract 0327
- Hunt BJ, Lämmle B, Nevard CHF, Haycock GB, Furlan M. Von Willebrand factor-cleaving protease in childhood diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Thromb Haemost* 2001; 85: 975-978
- Jastrzebska M, Torbus-Lisiecka B, Honczarenko K, Foltynska A, Chelstowski K, Naruszewicz M. Von Willebrand factor, fibrinogen and other risk factors of thrombosis in patients with a history of cerebrovascular ischemic stroke and their children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12: 132-140
- Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, Hallmans G. Prospective study on soluble thrombomodulin and Von Willebrand factor and the risk of ischemic and hemorrhagic stroke. *Thromb Haemost* 2002; 87: 211-217
- Johnson PW, Glennie MJ. Rituximab: mechanisms and applications. *Br J Cancer* 2001; 85: 619-623
- Jubinsky PT, Moraille R, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura in a newborn. *J Perinatol* 2003; 23: 85-87
- Kaever V, Resch K. *Antiphlogistika und Immuntherapeutika*. In: Forth E, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag München, Jena 2001
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-782
- Kaspar CK. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2: 7-10

- Kelton JG. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome: will recent insight into pathogenesis translate into better treatment? *Transfusion* 2002; 42: 388-392
- Kentouche K, Angerhaus D, Zintl F, Budde U. VWF-cleaving protease is decreased in the course of bone marrow transplantation – evidence for a role in BMT-associated thrombotic microangiopathy. *Ann Hematol* 2003; 82 (Suppl.): Abstract 135
- Kentouche K, Budde U, Furlan M, Scharfe V, Schneppenheim R, Zintl F. Remission of thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with compound heterozygous deficiency of solvent/detergent plasma. *Act Pædiatr* 2002; 91: 1056-1059
- Knöbl P, Haas M, Laczika K, Varadi K, Turecek PL. Immunoabsorption for the treatment of a patient with severe thrombotic thrombocytopenic purpura resistant to plasma exchange: kinetics of an inhibitor of ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 2003a; 1: 187-189
- Knöbl P, Laczika K, Staudinger T, Haas M, Derfler K, Frass M, Schreiner J, Varadi K, Turecek PL. Kinetic of inhibitors of Von Willebrand factor cleaving metalloprotease in three patients with severe thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2002; 81 (Suppl.): Abstract 166
- Knöbl P, Varadi K, Reiter R, Jilma B, Schwarz HP, Turecek PL. Changes in ADAMTS13 (VWF cleaving protease) activity after induced acute release of Von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2003b; 1 Suppl. 1 July: Abstract 0278
- Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for Von Willebrand factor-cleaving protease activity. *PNAS* 2002; 99: 11902-11907
- Koo BH, Oh D, Chung SY, Kim NK, Park S, Jang Y, Chung KH. Deficiency of Von Willebrand factor-cleaving protease activity in the plasma of malignant patients. *Thromb Res* 2002; 105: 471-476
- Koster T, Blann AD, BrietVandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of Von Willebrand factor on occurrence of deep vein thrombosis. *Lancet* 1995; 21: 804
- Kremer JA, Studt JD, Dermarmels F, Solenthaler M, Alberio L, Mansouri B, Fontana S, Tobler A, Lämmle B. Splenectomy in relapsing and plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Ann Hematol* 2003; 82 (Suppl.): Abstract 160
- Krizek DM, Rick ME. Clinical application of a rapid method using agarose gel electrophoresis and Western blotting to evaluate Von Willebrand factor protease activity. *Electrophoresis* 2001; 22: 946-949
- Lämmle B, Hunt BJ, Haycock GB, Furlan M. Reply to Rebuttal: Von Willebrand factor-cleaving protease in childhood diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Thromb Haemost* 2002; 87: 549-550
- Lämmle B, Kremer Hovinga JA, Studt JD, Alberio L. Severe deficiency of ADAMTS-13 is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003; DOI: 10.1046/j.1538-7933.2003.00378.x.
- Langer F, Bergmann F, Budde U, Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK. Prolonged inhibition of Von Willebrand factor-cleaving protease after splenectomy in a 22-year-old patient with acute and plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Brit J Hematol* 2002; 118: 271-274

- Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. Mild to moderate reduction of a Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003; 88: 1029-1034
- Lee TP, Bouhassira E, Lyubsky S, Tsai HM. ADAMTS13, the Von Willebrand factor cleaving metalloprotease, is expressed in the perisinusoidal cells of the liver. *Blood* 2002; 100: Abstract 1938
- Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Ginsburg D, Tsai HM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488-494
- Loof AH, Van Vliet HHDM, Kappers-Klunne MC. Low activity of Von Willebrand factor-cleaving protease is not restricted to patients suffering from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Brit J Hematol* 2001; 112: 1087-1088
- Lusher JM. Natural history of inhibitors in severe haemophilia A and B: incidence and prevalence. In: Rodriguez-Merchan EC, Lee CA (eds). *Inhibitors in patients with haemophilia*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK 2002
- Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves Von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98: 2730-2735
- Mannucci PM, Karimi M, Mosalao A, Canciani MT, Peyvandi F. Patients with localized and disseminated tumors have reduced but measurable levels of ADAMTS-13 (Von Willebrand factor cleaving protease). *Haematologica* 2003a; 88:454-458
- Mannucci PM, Vanoli M, Forza I, Canciani MT, Scorza R. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). *Haematologica* 2003b; 88: 914-918
- Mannucci PM. Consistency of ADAMTS-13 activity assays: a moderately optimistic view. *J Thromb Haemost* 2003c; 1: 1880-1881
- Matsushita T, Sadler JE. Identification of amino acid residues essential for Von Willebrand factor proline residues 702-704 in ristocetin mediated binding to platelet glykoprotein Ib. *J Biol Chem* 1995; 270: 13406-13414
- Mazzel C, Pepkowitz S, Klapper E, Goldfinger D. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura: a role for early vincristine administration. *J Clin Apheresis* 1998; 13: 20-22
- Mele L, Voso MT, Fianchi L, Leone G, Pagano L. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome after bupropion treatment for smoking cessation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 77-78
- Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII:Von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307: 1432-1435
- Moake JL. An update on the therapy of thrombotic thrombocytopenic purpura. In: Kaplan BS, Trompeter RS, Moake JL (eds). *Hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Marcel Dekker Inc, New York, 1992; 541-546
- Moake JL. Thrombotic Microangiopathies. *N Engl J Med* 2002a; 347: 589-600
- Moake JL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: the systemic clumping "plague". *Ann Rev Med* 2002b; 53: 75-88

- Moore JC, Hayward CPM, Warkentin TE, Kelton JG. Decreased Von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood* 2001; 98:1842-1846
- Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of VWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 2002; 42: 572-580
- Moschcowitz E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc NY Pathol Soc* 1924; 24: 21-24
- Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. Estimation of the Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to VWF. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1382-1385
- Oleksowicz L, Bhagwati N, DeLeon-Fernandez M. Deficient activity of Von Willebrand's factor cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 2244-2250
- Park YD, Yoshioka A, Kawa K, Ishizashi H, Yagi H, Yamamoto Y, Matsumoto M, Fujimura Y. Impaired activity of plasma Von Willebrand factor-cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:789-794
- Peyvandi F, Lavoretano S, De Cristofaro R, Ferrari S, Canciani MT, Mannucci PM. Modulation of the Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) activity by polymorphisms in the ADAMTS-13 gene. *Blood* 2003, 102 (11): Abstract 2967
- Pham PT, Danovitch GM, Wilkinson AH, Gritsch HA, Pham PCT, Eric TM, Kendrick E, Charles LR, Tsai HM. Inhibitors of ADAMTS13: A potential factor in the cause of thrombotic microangiopathy in a renal allograft recipient. *Transplant* 2002; 74: 1077-1080
- Pimanda J, Hogg P. Control of Von Willebrand factor multimer size and implications for disease. *Blood Reviews* 2002; 16: 185-192
- Pimanda JE, Chesterman CN, Hogg PJ. A perspective on the measurement of ADAMT13 in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003; 70: 257-262
- Plaimauer B, Wernhart W, Mohr G, Bruno K, Antoine G, Scheiflinger F. Recombinant expression of mutant ADAMTS-13 reassembling five mutations found in two brothers with congenital TTP. *Blood* 2003; 100 (11): Abstract 4035
- Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, Furlan M, Gerritsen H, Lämmle B, Schwarz HP, Scheiflinger F. Cloning, expression, and functional characterization of the Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002; 100: 3626-3632
- Qizilbash N, Duffy S, Prentice CR, Boothby M, Warlow C. Von Willebrand factor and risk of ischemic stroke. *Neurology* 1997; 49: 1552-1556
- Raife TJ, Atkinsons B, Christopherson P, Jozwiak M, Montgomery RR. Recombinant, truncated monomeric Von Willebrand factor (VWF) for the study of VWF proteolysis. *Thromb Haemost* 2001; Suppl July: Abstract 1667
- Raife TJ, Lentz SR, Atkinson BS, Vesely SK, Hessner MJ. Factor V Leiden: a genetic risk factor for thrombotic microangiopathy in patients with normal Von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Blood* 2002; 99: 437-442
- Reiter RA, Knöble P, Varadi K, Turecek PL. Changes in Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood* 2003; 101: 946-948

- Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, Canciani MT, Daina E, Bresin E, Contaretti S, Caprioli J, Gamba S, Ruggenti P, Perico N, Mannucci PM. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2002; 100: 778-785
- Remuzzi G. Is deficiency of ADAMTS-13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? No. *J Thromb Haemost* 2003a; 1: 632-634
- Remuzzi G. Severe deficiency of ADAMTS-13 is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003b; DOI: 10.1046/j.1538-7933.2003.00376.x.
- Reynolds PM, Jackson JM, Brine JA, Vivian AB. Thrombotic thrombocytopenic purpura – remission following splenectomy. Report of a case and review of the literature. *Am J Med* 1976; 61: 439-447
- Rick ME, Moll S, Taylor MA, Krizek DM, White GC, Aronson DL. Clinical use of a rapid collagen binding assay for Von Willebrand factor cleaving protease in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2002; 88: 598-604
- Ridolfi RL, Bell WR. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine* 1981; 60: 413-428
- Rock G, Porta C, Bobbio-Pallavicini E. Thrombotic thrombocytopenic purpura treatment in year 2000. *Hematologica* 2000; 85: 410-419
- Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spasoff RA. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med* 1991; 325: 393-397
- Rohsig LM, Damin DC, Stefani SD, Castro CG Jr, Roisenberg I, Schwartzmann G. Von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J med Biol Res* 2001; 34 (9): 1125-1129
- Rothschild C, Laurian Y, Satre EP, Borel Derlon A, Chambost H, Moreau P, Goudemand J, Parquet A, Peynet J, Vicariot M, Beurrier P, Claeysens S, Durin A, Faradji A, Fressinaud E, Gaillard S, Guerin V, Guerois C, Pernod G, Pouzol P, Schved JF, Gazengel C. French previously untreated patients with severe hemophilia A after exposure to recombinant factor VIII: incidence of inhibitor and evaluation of immune tolerance. *Thromb Haemost* 1998; 80: 779-783
- Rubenstein M, Kagan B, MacGillviray M. Unusual remission in a case of thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome following fresh blood exchange transfusions. *Ann Intern Med* 1959; 51: 1409-1419
- Ruggeri ZM, Zimmermann TS. The complex multimeric composition of factor VIII/Von Willebrand factor. *Blood* 1981; 57: 1140-1143
- Ruggeri ZM. Structure and Function of Von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1999; 82: 576-584
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1335-1342
- Rutkow IM. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and splenectomy: a current appraisal. *Ann Surg* 1978; 188: 701-705
- Sadler EJ, Gralnick HR. Commentary: A new classification for Von Willebrand disease. *Blood* 1994; 84: 676-679

- Sadler EJ. A revised classification of Von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1994; 71: 520-525
- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. *PNAS* 2002; 99:11552-11554
- Savasan S, Lee SK, Ginsburg D, Tsai HM. ADAMTS13 gene mutation in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with previously reported normal VWF cleaving protease activity. *Blood* 2003; 101: 449-4451
- Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients: a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia* 1999; 5: 145-154
- Scheiflinger F, Knöbl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003; 102: 3241-3243
- Schneppenheim R, Angerhaus D, Obser T, Scheiflinger F, Will K, Budde U. Molecular mechanisms of hereditary ADAMTS13 deficiency. *Blood* 2003a; 100 (11): Abstract 309
- Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, Hasenpflug W, Häberle J, Kentouche K, Kohne E, Kurnik K, Mueller-Wiefel D, Obser T, Santer R, Sykora KW. Von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. *Blood* 2003b; 101: 1845-1850
- Schulz A, Sitzler G, Scheid C, Deutsch HJ, Chemnitz J, Abelius R, Rieping M, Diehl V, Söhngen D. A case of thrombotic thrombocytopenic purpura in an adult treated with vincristine. *Ann Hematol* 1999; 78: 39-42
- Schwartz J, Eldor A, Szold A. Laparoscopic splenectomy in patients with refractory or relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arch Surg* 2001; 136: 1236-1238
- Shenkman B, Budde U, Angerhaus D, Lubetsky A, Savion N, Seligson U, Varon D. Diagnosis of various types of thrombotic thrombocytopenic purpura by cone and plate(let) analyzer. *Blood* 2002; 100 (11): Abstract 2700
- Shenkman B, Inbal A, Tamarin I, Lubetsky A, Savion N, Varon D. Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura based on modulation by patient plasma of normal platelet adhesion under flow condition. *Brit J Hematol* 2003; 120: 597-604
- Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human Von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2939-2950
- Siekman J, Turecek PI, Schwarz HP. The determination of Von Willebrand factor activity by Collagen binding assay. *Haemophilia* 1998; 4 (Suppl.3): 15-24
- Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for Von Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003; 102: 3232-3237
- Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the Von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biochem* 2001; 130: 475-480
- Studt JD, Böhm M, Budde U, Girma JP, Lämmle B. Multicenter comparison of assays for Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity. *J Thromb Haemost* 2003b; 1 (Suppl 1): Abstract 312

- Studt JD, Böhm M, Budde U, Girma JP, Lämmle B. Multicenter comparison of assays for Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity. *Ann Hematol* 2003c; 82 (Suppl 1). Abstract 292
- Studt JD, Böhm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lämmle B. Measurement of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: A multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost* 2003a; 1: 1882-1887
- Studt JD, Kremer Hovinga JA, Alberio L, Bianchi V, Lämmle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in thrombotic microangiopathies: diagnostic experience 2001/2002 of a single research laboratory. *Swiss Med Wkly* 2003d; 133: 325-332
- Studt JD, Mansouri B, Fontana S, Kremer JA, Lämmle B. Observations on immunoadsorption (IA) as an adjunctive therapy for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Ann Hematol* 2003e; 82 (Suppl.): Abstract 293
- Sugio Y, Okamura T, Shimoda K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Niho Y, Inaba S, Fujimura Y. Ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with an IgG-type inhibitor to Von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Int J Hematol* 2001; 74: 347-351
- Sweeney JD, Killion KM, Pruet CF, Spaulding MB. Von Willebrand factor in head and neck cancer. *Cancer* 1990; 66: 2387-2389
- Te Loo DMWM, Levtchenko E, Furlan M, Roosendaal GPM, van den Heuvel LPWJ. Autosomal recessive inheritance of Von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 762-765
- Thompson P, Li ZY, Oton AB, Morgensztern D, Lian EC. Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with acquired VWF protease (ADAMTS13) deficiency was heralded by variable stimuli and lacked a good correlation between platelet counts and VWF protease levels. *J Thromb Haemost* 2003; 1 Suppl. 1 July: Abstract 0323
- Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Aleksic N; Folsom AR. Coagulation factors, inflammation markers and venous thromboembolism: the longitudinal investigation thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med.* 2002; 113: 689-690
- Tsai HM, Chandler WL, Sarode R, Hoffman R, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Wong CS, Williams GD, Tarr PI. Von Willebrand factor and Von Willebrand factor-cleaving metalloprotease activity in Escherichia Coli 0157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 2001a; 49: 653-659
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Lab* 2001b; 47: 387-392
- Tsai HM, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339: 1585-1594
- Tsai HM, Rice L, Sarode R, Chow TW, Moake JL. Antibody inhibitors to Von Willebrand factor metalloproteinase and increased binding of Von Willebrand factor to platelets in Ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2000; 132: 794-799
- Tsai HM, Sarode R, Downes KA. Ultralarge Von Willebrand factor multimers and normal ADAMTS13 activity in the umbilical cord blood. *Thromb Res* 2003; 108: 121-125
- Tsai HM, Shulman K. Rituximab induces remission of cerebral ischemia caused by thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2003; 70: 183-185

- Tsai HM. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol* 2003a; 14: 1072-1081
- Tsai HM. Deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003b; 23: 388-396
- Tsai HM. High titers of inhibitors of Von Willebrand factor-cleaving metalloproteinase in a fatal case of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 2000; 65: 251-255
- Tsai HM. Is severe deficiency of ADAMTS-13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? Yes. *J Thromb Haemost* 2003c; 1: 625-631
- Tsai HM. Physiologic cleavage of Von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires Calcium ion. *Blood* 1996; 10: 4235-4244
- Tsai HM. Severe deficiency of ADAMTS-13 is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2003d; DOI: 10.1046/j.1538-7933.2003.00377.x.
- Tsai HM. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med* 2002; 80: 639-647
- Turecek PL, Siekmann J, Schwarz HP. Comparative study on Collagen-binding Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Ristocetin Cofactor activity of Von Willebrand factor. *Sem Thromb Haemost* 2002; 28: 149-160
- Van der Plas RM, Schiphorst ME, Huizinga EG, Hene RJ, Verdonck LF, Sixma JJ, Fijnheer R. Von Willebrand factor proteolysis is deficient in classic, but not in Bone Marrow Transplantation-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1999; 93: 3798-3802
- Van Gool S, Brock P, Van Laer P, Van Damme-Lomaerts R, Proesmans W, Casteels-Van Daele M. Successful treatment of recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura with plasmapheresis and vincristine. *Eur J Pediatr* 153: 517-519
- Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake MA, Raskop GE. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood* 2003; 102: 60-68
- Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 2001; 98: 1765-1772
- von Depka Prondzinski M. Blutgerinnung: Aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. UNI-MED Verlag AG, Bremen 2002
- Von Willebrand EA. Hereditär pseudohemofili. *Finska Läk Sällsk Handl* 1926; 68: 87-112
- Warwicker P, Goodship THJ, Donne RL, Pirson Y, Nicholls A, Ward RM, Tumpenny P, Goodship JA. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 1998; 53: 836-844
- Wichmann MW, Meyer G, Hiller E, Schildberg FW. Laparoskopische Splenektomie bei thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura. *Dtsch Med Wschr* 2001; 123: 299-302
- Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ. Control of Von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med* 2001; 193:1341-1349
- Yagi H, Konno M, Kinoshita S, Matsumoto M, Ishizashi H, Matsui T, Titani K, Fujimura Y. Plasma of patients with Upshaw-Schulman syndrome, a congenital deficiency of Von

- Willebrand factor-cleaving protease activity, enhances the aggregation of normal platelets under high shear stress. *Brit J Hematol* 2001; 115: 991-997
- Yoo G, Blombäck M, Schenk-Gustafsson K, He S. Decreased levels of Von Willebrand factor-cleaving protease in coronary heart disease and thrombotic thrombocytopenic purpura: study of a simplified method for assaying the enzyme activity based on ristocetin-induced platelet aggregation. *Brit J Hematol* 2003; 121: 123-129
- Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001a; 276: 41059-41063
- Zheng X, Kaufman R, Goodnough LT, Sadler JE. Prospective Study of the Effect of plasma exchange on Von Willebrand factor cleaving protease and autoantibody inhibitor levels in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001b, 98: Abstract 3141
- Zheng X, Majerus EM, Sadler JE. ADAMTS13 and TTP. *Curr Opin Hematol* 2002a; 9: 389-394
- Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Characterization of recombinant ADAMTS13 in COS7 cells and identification of domains required for cleavage of Von Willebrand factor. *Blood* 2002; 100 (11): Abstract 974
- Zheng X, Palleria AM, Goodnough LT, Sadler E, Blinder MA. Remission of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with cyclophosphamide and Rituximab. *Ann Intern Med* 2003; 138: 105-108
- Zimmermann TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. Subunit composition of plasma Von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB Von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (Types IIC, IID and IE). *J Clin Invest* 1986; 77: 947-951

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung	LDH	Lactatdehydrogenase-Konzentration
ADAMTS-13	13. Mitglied der „a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs“-Familie (Protein)	LE	Lungenembolie
ADAMTS13	13. Mitglied der „a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs“-Familie (Gen)	m	männlich
AGE	Agarose-Gelelektrophorese	MAHA	mikroangiopathische, hämolytische Anämie
Akt.	Aktivität	MDS	myelodysplastisches Syndrom
AML	akute myeloische Leukämie	mE	Milli-Extinktion
APS	Antiphospholipidsyndrom	mg	Milligramm
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit	min	Minuten
BCT	Behring Coagulation Timer	ml	Milliliter
CAPS	catastrophic antiphospholipid syndrome	mmol	Millimol
cDNA	komplementäre DNA	mol	Mol
D+/D- HUS	Diarrhoe-positives/Diarrhoe-negatives hämolytisch-uremisches Syndrom	MW	Mittelwert
DIC	disseminated intravascular coagulation (Verbrauchskoagulopathie)	n	Anzahl
DNA	Desoxyribonucleinsäure	NHP	normaler humaner Plasmapool
ED	Erstdiagnose	nl	Nanoliter
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure·Na ₂ -Salz	p	Irrtumswahrscheinlichkeit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FFP	fresh frozen plasma	PCR	Polymerasekettenreaktion
g	Erdbeschleunigung	PefaBloc SC	4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
GR	Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation (graft rejection)	Pur.rh.	Purpura rheumatica
h	Stunde(n)	R	Korrelationskoeffizient
Hb	Hämoglobingehalt	RT	Raumtemperatur
HELLP	schwere Komplikation der Schwangerschaftsgestose mit hemolysis, elevated liver enzymes und low platelets	RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
HIT II	Heparin induzierte Thrombozytopenie, Typ II	SD	Standardabweichung
HUS	hämolytisch-uremisches Syndrom	SDS	Natriumdodecylsulfat
HIF	Herzinfarkt	SLE	systemischer Lupus erythematoses
IgG	Immunglobulin vom G-Typ	SNP	single nucleotide polymorphism
ITP	idiopathische Thrombozytopenie	SS	Schwangerschaft
Kap.	Kapitel	SSc	systemische Sklerose
kDa	Kilodalton	Tab.	Tabelle
KHK	koronare Herzkrankheit	Thr	Thrombozytenanzahl
KMT	Knochenmarkstransplantation	TMA	thrombotische Mikroangiopathie
l	Liter	TRIS	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
		TPZ	Thromboplastinzeit
		TTP	thrombotisch
		U	thrombozytopenische Purpura
		µg	Units (Einheiten)
		µl	Mikrogramm
		VK	Mikroliter
		VOD	Variationskoeffizient
		VT	hepatic veno-occlusive disease
		VWF:Ag	venöse Thrombosen
		VWF	Von Willebrand Faktor-Antigen
		VWF:RCo	Von Willebrand Faktor-Ristocetin-Kofaktor-Aktivität
		VWS	Von Willebrand Syndrom
		w	weiblich

8. Anhang

8.1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 2000 bis Dezember 2003 in der Abteilung für Hämostaseologie im Zentrum der Inneren Medizin I im Klinikum der Johann Wolfgang von Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt und von Frau Prof. Dr. Inge Scharrer betreut.

Frau Prof. Dr. Inge Scharrer danke ich an erster Stelle, nicht nur für ihre engagierte Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sondern darüber hinaus für ihren hartnäckigen Optimismus und das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Roland Prinzinger danke ich sehr herzlich für die freundliche fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Kollegen, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre. Dr. Wolfgang Miesbach, Dr. Manuela Krause und Dr. Charis von Auer danke ich insbesondere für die Bereitstellung der klinischen Daten. Herrn Thomas Vigh danke ich für seine Unterstützung bei Darstellung der VWF-Multimeren. Meinen Mitstreitern im Labor Genet Asmelash, Birgit Putz, Vida Meyer, Ingrid Stier-Brück und Dr. Ferial Peyvandi danke ich für all die „Einfriertage“ und ihre großzügige Hilfsbereitschaft bei Durchführung der verschiedensten Untersuchungen. Des weiteren gilt mein Dank Gilla Eckert, Anne Kopalla, Steffanie Franke und natürlich Carola Rabenstein, die alle in unterschiedlichster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Unseren Patienten, insbesondere den Patienten mit TTP, danke ich für die Bereitstellung der Plasmaproben.

Herrn Dr. Fritz Scheifflinger, Herrn Dr. Gerhard Antoine und Frau Dr. Barbara Plaimauer von Baxter-BioSciene (Orth, Österreich) danke ich für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau Dr. Frauke Schmidt-Lange gilt mein besonderer Dank für die sorgfältige Beseitigung meiner Komma- und Rechtschreibfehler.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meiner Gemeinde und meinen Freunden, die immer wieder Interesse am Fortgang dieser Arbeit gezeigt haben und mich darin mit viel Verständnis erduldet, ermutigt und unterstützt haben.

8.2. Publikationen

8.2.1. Publikationen im Rahmen der Dissertation:

Böhm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of Von Willebrand factor cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Annal Hematol* 2002, 81:430-435

Böhm M, Betz C, Stier-Brück I, Scharrer I. Early and rapid diagnosis of acute TTP by measuring activity of Von Willebrand Factor cleaving metalloprotease (ADAMTS13): a case report. In: Scharrer I, Schramm W (eds): 32nd Hemophilia Symposium Hamburg 2001, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2002

Böhm M, Gerlach R, Beecken WD, Scheuer T, Stier-Brück I, Scharrer I. ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis. *Throm Res* 2003; 111: 33-37

Studt JD, Böhm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lämmle B. Measurement of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: A multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1882-1887

Böhm M, Miesbach W, Krause M, Vigh T, Scharrer I. Von Willebrand factor cleaving protease in various thrombotic, hemolytic and autoimmune disorders. In: Scharrer I, Schramm W (eds): 33rd Hemophilia Symposium Hamburg 2002. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2003

Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm M, Budde U, Dong JF, Friedman KD, Galbusera M, Girma JP, Moake J, Rick ME, Studt JD, Turecek PL, Mannucci PM. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1601-1609

Böhm M, Miesbach W, Krause M, von Auer C, Scharrer I. The course of ADAMTS-13 activity, inhibitor titre and C reactive protein levels in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma exchange and vincristine. Submitted

Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, Zimmermann K, Scharrer I, Peyvandi F, Galbusera M, Remuzzi G, Böhm M, Plaimauer B, Lämmle B, Scheiffliner F. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. Submitted

Abstracts:

Böhm M, Krause M, Vigh T, Scharrer I. Von Willebrand Factor-cleaving protease activity in TTP using a new method based on the positive correlation between vWF multimeric size and Ristocetin Cofactor activity. *Blood* 2001; 98 (11), Abstract 130

Böhm M, Bergmann L, Betz C, Scharrer I. The Effect of Plasma exchange therapy on Von Willebrand Factor cleaving protease activity of ADAMTS13 and on autoantibody inhibitor levels in index episodes and relapses of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002, 100 (11): Abstract 2705

Böhm M, Mosebach U, Krause M, Vigh T, Stier-Brück I, Scharrer I. Correlation of VWF-cleaving protease activity, VWF:Ag and frequency of relapses in 17 TTP-patients observed between 1982 and 2001. *Annal Hematol* 2002; 81 (Suppl. 1), Abstract 028

Böhm M, Vigh T, Scharrer I. The significance of the VWF-cleaving protease in the pathogenesis of TTP. *Annal Hematol* 2002; 81 (Suppl. 1): Abstract 29

Böhm M, Peyvandi F, Krause M, Miesbach W, von Auer C, Scharrer I. Mild ADAMTS-13 deficiency in patients with ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2003, 1 (Suppl. 1): Abstract 990

Böhm M, Gerlach R, Beecken WD, Scheuer T, Stier-Brück I, Scharrer I. Malignancy and metastasis is not associated with decreased ADAMTS-13 activity in patients with brain tumors and prostate tumors. *J Thromb Haemost* 2003, 1 (Suppl. 1): Abstract 1670

Böhm M, Betz C, Krause M, Miesbach W, Bergmann L, Scharrer I. ADAMTS-13 activity and corresponding inhibitor titers during plasmaexchange therapy in 13 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *J Thromb Haemost* 2003, 1 (Suppl. 1): Abstract 318

Böhm M, Burchert A, Scharrer I. ABO blood group influences the clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003, 102 (11): Abstract 4497

Böhm M, Antoine G, Plaimauer B, Krause M, Scheiflinger F, Scharrer I. Determination of ADAMTS-13 activity in patients with venous thrombosis and 70 patients with ischemic stroke revealed the first case of partial and congenital ADAMTS-13 deficiency as possible cause of ischemic stroke. *Blood* 2003, 102 (11): Abstract 2975

Böhm M, Miesbach W, Krause M, Von Auer C, Scharrer I. Sensitivity and specificity of severe ADAMTS-13 deficiency for thrombotic thrombocytopenic purpura: investigation of ADAMTS-13 activity in 47 patients with TTP and 352 patients with various other disorders. *Hämostaseologie* 2004, 24: Abstract V97

8.2.2. Weitere Publikationen

Böhm M, Löw R, Haag-Kerwer A, Lüttge U, Rausch T. Evaluation of Comparative DNA Amplification Fingerprinting for Rapid Species Identification within the Genus *Clusia*. *Botanica Acta* 1993, 106: 448-453

Rausch T, Böhm M, Dahse I, Weil M, Verstappen R. Sugar transport into plasma membrane vesicles of transformed tobacco cells: uptake of sucrose but not of hexoses is stimulated by Δ pH. *Journal of Experimental Botany* 1994, 45 (271): 245-252

Gerlach R, Yahya H, Rohde S, Böhm M, Berkefeld J, Scharrer I, Seifert V, Raabe A. Increased incidence of thrombophilic abnormalities in patients with cranial dural arteriovenous fistulae. *Neurol Res* 2003; 25: 745-748

Gerlach R, Scheuer T, Böhm M, Beck J, Woszczyk A, Raabe A, Scharrer I, Seifert V. Increased levels of plasma tissue factor pathway inhibitor in patients with glioblastoma and intracerebral metastases. *Neurol Res* 2003; 25: 335-338

8.3. Lebenslauf

Name Martina Böhm
Geburtsdatum 11. 11. 1966
Geburtsort Meschede

Ausbildung

08/73 – 08/77 Grundschule Velmede
10/77 - 07/86 Städtisches Gymnasium Steinheim
Abschluß: Abitur
10/86 - 06/92 Studium an der JWG Universität, Frankfurt am Main
Abschluß: Diplom in Biologie mit der Gesamtnote „sehr gut“
Titel der Diplomarbeit: Untersuchungen zum Zuckertransport an transformierten Zellen
01/93 - 12/93 Studium an der University of the Nations in Amsterdam und Jerusalem
Kursinhalte: Kirchengeschichte, Dogmatik im Christentum und im Islam, Arabische Kultur und Sprache, Interkulturelle Kommunikation

Beschäftigung

07/92 - 12/92 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Rausch, Institut für Botanik an der JWG Universität Frankfurt am Main
Forschungsbereiche: Molekularbiologische Untersuchungen an Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase, DNA- Fingerprinting von verschiedenen Spezies der tropischen Pflanze Clusia
02/94-08/94 Mitarbeiterin im Kindergarten der Gustav-Adolf-Gemeinde, Frankfurt
09/94-05/97 Mitarbeiterin in der University of the Nations in Jerusalem, Israel
Arbeitsbereiche: Interkulturelle Erwachsenenbildung; Verwaltung und Organisation; Supervision und Lehre
11/97-02/00 Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von PD Dr. K. Roth, Abteilung für molekulare Virusdiagnostik im DRK-Blutspendedienst Hessen
Arbeitsbereiche: PCR-Nachweis von HBV-, HCV- und HIV-Viren; Validierung und Optimierung verschiedener Methoden
seit 02/00 Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Scharrer, Abteilung für Hämostaseologie im Klinikum der JWG Universität Frankfurt am Main
Arbeitsbereiche: VWF Metabolismus bei Patienten mit TTP; Design, Betreuung und Auswertung von klinischen Studien; Entwicklung und Optimierung hämostaseologischer Teste

Frankfurt am Main, den 30. Januar 2004