

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie,
Klinik für Anästhesiologie

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Andreas Humpe

***Relevanz des ultragroßen und thrombozytären von
Willebrand Faktors für die primäre Hämostase und in der
Diagnostik des von Willebrand Syndroms***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. Thorsten Kragh

aus

München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Spannagl

Mitberichterstatter: PD Dr. Korbinian Lackermair

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2023

meiner lieben Angie

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|------|
| 1 | Inhaltsverzeichnis..... | IV |
| 2 | Abkürzungsverzeichnis | V |
| 3 | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis..... | VI |
| 4 | Publikationsliste | VII |
| 4.1 | Originalarbeiten | VII |
| 4.2 | Abstracts | VIII |
| 4.3 | Eingeladene Vorträge | IX |
| 5 | Eigener Beitrag zu den in dieser Arbeit kumulierten Veröffentlichungen..... | X |
| 5.1 | Beitrag zu Paper I | X |
| 5.2 | Beitrag zu Paper II..... | X |
| 6 | Einführung..... | 1 |
| 6.1 | Ziele der Arbeit..... | 3 |
| 6.2 | Theoretischer Hintergrund..... | 4 |
| 6.2.1 | Zelluläre Hämostase | 4 |
| 6.2.2 | Von Willebrand Syndrom | 8 |
| 6.2.3 | Relevanz der ultragroßen VWF Multimere..... | 10 |
| 6.2.4 | Mikroumgebung | 12 |
| 6.3 | Eigene Arbeiten | 15 |
| 6.4 | Ausblick..... | 16 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 17 |
| 8 | Abstract | 19 |
| 9 | In dieser Arbeit kumulierte Publikationen | 21 |
| 10 | Literatur..... | 22 |
| 11 | Anhang | 25 |
| 11.1 | Ein didaktisches Werkzeug zur Veranschaulichung der Mikroumgebung | 25 |
| 11.2 | Erläuterung zum Anhang 11.1 | 26 |
| 12 | Danksagung..... | 27 |
| 13 | Affidavit | 28 |

2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ADAMTS13 | a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13 |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CT | Closure Time; Verschlusszeit |
| ECM | extrazellulären Matrix |
| EKZ | extrakorporaler Zirkulation |
| GP | Glykoprotein |
| IL | Interleukin |
| OCS | offenes kanalikuläres System |
| PFA-200 | platelet function analyzer |
| POCT | point of care test |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| ULVWF | ultragroße von Willebrand Faktor Multimere |
| VWD | Von Willebrand Erkrankung/ Willebrand-Jürgens-Erkrankung |
| VWF | von Willebrand Faktor |
| WPK | Weibel-Palade Körperchen |

3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|---|
| Tabelle 1: Inhalt der Plättchengranula. Übersicht der Hauptbestandteile in α - und δ -Granula der Plättchen. [12] | 6 |
| Tabelle 2: Übersicht der Subtypen des VWDs [18]..... | 8 |

Abbildung 1: primäre Hämostase – Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. An einer Endothelläsion kommen Kollagene der extrazellulären Matrix in Kontakt mit dem Blutstrom, der nicht aktivierte Thrombozyten, VWF und Fibrinogen mitführt. Am Kollagen lagert sich VWF an und wird durch Streckung aktiviert. Daran binden nicht aktivierte Thrombozyten und werden aktiviert. Durch die Bindung von VWF und Fibrinogen an Plättchenrezeptoren aggregieren weitere Thrombozyten und bilden den lockeren Plättchenthrombus, der einen ersten schnellen Verschluss der Verletzung bewirkt. (nach Abbildungen aus Yau et al. [10])

Abbildung 2: VWF Monomer; das VWF Monomer wird im Golgiapparat synthetisiert und beim Transport in die Weibel-Palade-Körperchen oder α -Granula das Propeptid durch Furin zwischen D2 und D'D3 abgespalten. Die Dimerisierung erfolgt über Disulfidbindungen am CTCK Ende, während die Multimerisierung am D'D3 Ende stattfindet. In der Zwischenzeit wurden die klassischen A, C und D Domänen weiter differenziert. Die Unterdomeinen (schwarz und grau) von VWD1-4 haben einen hohen Anteil Cystein und bilden daher viele intramolekulare Disulfidbrücken aus, sodass Laschen in der Quartärstruktur entstehen. VWC1-6 Domänen besitzen ebenfalls Disulfidbrücken, die einen langen Stiel bilden. Die globuläre Struktur der VWA1-3 Domänen wird dagegen durch einen hydrophoben Kern generiert. Bindungspartner an D'D3 sind Faktor VIII, an A1 Plättchenrezeptor GP Ib α , an A2 Schnittstelle für ADAMTS13, an A3 Kollegen und an die RGD Sequenz in C4 Plättchenrezeptor Integrin α IIb β 3. (vereinfacht nach einer Abbildung aus Zhou et al. [24])

Abbildung 3: Diffusion sekretierter Teilchen im Blutstrom. Affeld et al. simulierten die diffusive Ausbreitung in Kombination mit der Konvektion des Blutstroms (schwarze Pfeile) von ADP, das von einem adhärennten Plättchen bei Degranulation freigesetzt wurde. Da die gleichen Gesetze der Thermodynamik für alle gelösten Teilchen gelten, kann ähnliches Verhalten für den von Thrombozyten freigesetzten VWF angenommen werden. Die konzentriert Wolke um das Plättchen verdünnt sich mit Abstand zum Plättchen und die Teilchen breiten sich entsprechend der Fickschen Gesetze nach außen aus. Durch die Konvektion verschiebt sich die konzentrische Ausbreitung. (nach einer Abbildung aus Affeld et al. [43])

Abbildung 4: Spiderman der primären Hämostase, Comic zur Versinnbildlichung der in 6.4 dargelegten komplexen Vorgänge der Mikroumgebung einer Gefäßverletzung. Die Thrombozyten wurden farblich dem Actionhelden Spiderman nachempfunden, die den VWF wie Spinnfäden nutzen, um aus schneller Strömung sofort am Ort der ‚Zerstörung‘ in Aktion treten zu können. Das kleine Bild im Bild oben rechts zeigt die Situation eines VWD Typ 3 Patienten, wenn kein VWF vorhanden ist. Die Flussrichtung besteht von rechts nach links. (gezeichnet von Sara Luiza Joy Krippgans, mit freundlicher Überlassung der Rechte).....

Abbildung 5: Erläuterung zu Abbildung 3: Spiderman der primären Hämostase, 1) Erythrozyt im Blutstrom, 2) Thrombozyt, 3) Thrombozyt über GP1b Rezeptor gebunden an VWF, 4) aktivierter Thrombozyt adhärennt an Kollagenphasern der extrazellulären Matrix (ECM), 5) Endothelzelle, 6) aktivierte Endothelzelle, 7) ultralarge VWF, 8) VWF gebunden an Kollagen, 9) P-Selektin

4 Publikationsliste

4.1 Originalarbeiten

Comparison of forensic anthropometrical techniques. Reliability of an imaging procedure (2011); Kragh T; Holley S; Kirchhoff S; Fischer F; Grupe G; Graw M; *Rechtsmedizin*

Biocompatibility Material Test for Cardiovascular Devices using Stagnation Point Flow (2013); Schaller J; Kragh T; Reininger AJ; Goubergrits L; Kertzscher U; Spannagl M; Affeld K; *Biomed Eng*

High Shear Dependent vonWillebrand Factor Self-assembly Fostered by Platelet Interaction and Controlled by ADAMTS13 (2014); Kragh T; Napoleone M; Fallah MA; Gritsch H; Schneider MF; Reininger AJ; *Thromb Res*

Platelet adhesion, aggregation, and embolism on artificial surfaces in non-parallel blood flow (2015); Kragh T; Schaller J; Kertzscher U; Affeld K; Reininger AJ; Spannagl M; *Microfluidics Nanofluidics*

Dissertation: Bedeutung der scherratenabhängigen Selbstassemblierung des von Willebrand Faktors und der Thrombozytenaggregation an natürlichen und künstlichen Oberflächen für die primäre Hämostase (2015); Kragh T

Thrombelastometry – internal and external quality control (2016); Kragh T, Giebl A, Dick A, Kutsch M, Spannagl M; *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*

The role of ultralarge multimers in recombinant human von Willebrand factor – a review of physico-and biochemical studies and findings in in vivo models and in humans with von Willebrand disease (2017); Turecek PL, Spannagl M, Kragh T, Allmaier G, Turecek M, Schrenk G, Gritsch H, Obermann-Slupetzky O, Ewenstein BM, Valentino LA; *Haemostaseologie*

Sensitive and specific assessment of recombinant von Willebrand factor in platelet function analyser (2018); Pekrul I, Kragh T, Turecek PL, Novack AR, Ott HW, Spannagl M; *Platelets*

External quality assessment for the quality assurance of haemostaseological global tests/POCT (2018); Kragh T, Giebl A, Müller M, Kutsch M, Spannagl M; *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*

Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? (2019); Goldmann L, Duan R, Kragh T, Wittmann G, Weber C, Lorenz R, von Hundelshausen P, Spannagl M, Siess W; *Blood Adv*

A novel approach to laboratory assessment and reporting of platelet von Willebrand factor (2021); Kragh T, Pekrul I, Ott HW, Spannagl M, Möhnle P; *Platelets*

4.2 Abstracts

Kragh T, Holley S, Kirchhoff S, Fischer F, Grupe G, Graw M (2010) Methodenvergleich zur Einschätzung der Reliabilität eines bildgebenden Verfahrens (CT) hinsichtlich forensisch anthro-pometrischer Zwecke. Treffen d. Oberrheinischen Rechtsmediziner und Tagung d. deut. Gesellschaft f. Rechtsmedizin Region Süd

Kragh T, Napoleone M, Schaller J, Spannagl M, Affeld K, Reininger A (2011) Platelet adhesion and aggregation in stagnation point flow to quantify thrombogenicity and establish computer-models of implantable material biocompatibility. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Napoleone M, Schaller J, Affeld K, Ehrlich H, Spannagl M, Scheiflinger F, Reininger A (2012) The effect of stagnation point flow on the characteristics of von Willebrand factor mediated platelet deposition. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Schaller J, Spannagl M, Kertzscher U, Reininger A., Affeld K (2013) Platelet Deposition in a Stagnation Point Flow Correlates with Upstream Convective Transport towards the Wall. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Napoleone M, Angerer J, Fallah M, Schneider M, Reininger A (2013) In vitro High Shear Blood Flow Experiments Illustrate Mechanisms of Hemostasis Involving ultra-large Von Willebrand Factor, ADAMTS13 and Complex Flow Conditions. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Schaller J, Kertzscher U, Affeld K, Reininger A, Spannagl M (2014) Platelet adhesion, aggregation, and embolism on artificial surfaces in complex blood flow. Hämophilie Symposium in Wildbad Kreuth

Kragh T, Napoleone M, Fallah M, Gritsch H, Schneider M, Reininger A (2014) High Shear Dependent von Willebrand Factor Self-assembly Fostered by Platelet Interaction and Controlled by ADAMTS13. Hämophilie Symposium in Hamburg

Kragh T, Reininger A, Spannagl M (2015) High Shear Dependent von Willebrand Factor Self-assembly Assay Extends PFA Based Primary Hemostasis Diagnostics. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Schaller J, Kertzsch U, Affeld K, Reininger AJ, Spannagl M (2016) Platelet adhesion, aggregation, and embolism on artificial surfaces in complex blood flow. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Gärtner G, Müller M, Spannagl M (2016) Faktor VIII Messung zum Monitoring der Hämophilietherapie. Pfizer Berlin-Symposium

Kragh T, Spannagl M (2017) Supra-normal closure time caused by recombinant von Willebrand factor in PFA. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Pekrul I, Spannagl M (2017) Primary Hemostasis in Severe von Willebrand Disease Patient's Blood Is Reconstituted in vitro by Ultralarge von Willebrand Factor Multimers. XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis

Kragh T, Pekrul I, Spannagl M (2019) Functional Characterisation of a von Willebrand factor concentrate with low factor VIII content – multimeric and flow chamber analysis and a case report. Jahrestagung der GTH

Kragh T, Möhnle P, Pekrul I, Spannagl M (2019) Ongoing effect of therapeutic rVWF in patients with severe VWD – effect on primary haemostasis under high shear stress persists several hours. 50. Hamburger Hämophilie Symposium

Kragh T, Spannagl M, Ott HW, Möhnle P, Pekrul I (2020) The super glue of ultra-large multimers – characterisation of recombinant and platelet derived von Willebrand factor. ISTH 2020 Virtual Congress

4.3 Eingeladene Vorträge

Von Willebrand Factor the counter-intuitive Haemostasis Protein (2013) Hämophilie Symposium in Wildbad Kreuth

Rekombinanter Willebrand Faktor (VEYVONDI) im Fluß: Daten aus Flußkammer- und PFA-Experimenten (2020) Gemeinsames Jahressymposium der IGLD in Frankfurt am Main

5 Eigener Beitrag zu den in dieser Arbeit kumulierten Veröffentlichungen

5.1 Beitrag zu Paper I

Der Beitrag zu Paper I bestand in der Erarbeitung des Studiendesigns, der Durchführung der experimentellen Datenerfassung in Zusammenarbeit mit den technischen Mitarbeitern und der statistischen Auswertung in wesentlichen Anteilen. Die geteilte Erstautorenschaft rechtfertigt sich aus der gemeinsamen Ausarbeitung und Revision des Manuskripts.

5.2 Beitrag zu Paper II

Der Beitrag zu Paper II bestand im Erarbeiten des Studiendesigns, der Entwicklung des Versuchsaufbaus, der Organisation und Durchführung der experimentellen Datenerfassung, der statistischen Datenauswertung sowie Entwicklung der Rechenmodelle in wesentlichen Anteilen. Die geteilte Erstautorenschaft rechtfertigt sich aus der gemeinsamen Ausarbeitung des klinischen Studiendesigns, der Auswertung und Interpretation der Daten, sowie der Revision des Manuskripts.

6 Einführung

Aus historischer Sicht und vereinfacht dargestellt reguliert die Hämostase das sensible Gleichgewicht zwischen strömendem Blut im Gefäßsystem und dem Sistieren einer Blutung im Fall einer Gefäßleckage. Die Kunst eines funktionierenden Gerinnungssystems besteht darin, stets das situationsgerechte Maß zwischen Fließen und Stillstand zu gewährleisten. Eine Dysregulation kann zu Thromboembolien mit ischämischer Versorgungslage distaler Gewebereiche oder einem Blutverlust aus dem vaskulären System führen. So schnell die Gerinnungsreaktion an einer Läsionsstelle eingeleitet wird, so deutlich muss sie örtlich und zeitlich auf diese Situation begrenzt werden. [1, 2]

Eine Einteilung in primäre (zelluläre) und sekundäre (plasmatische) Gerinnung suggeriert einen streng sequentiellen, kaskadenartigen Ablauf, der heutzutage tatsächlich insbesondere aufgrund seiner Anschaulichkeit für eine systematische Labordiagnostik herangezogen wird. Sie erklärt nicht, wie die Hämostase reguliert wird. [3] Eine genauere Aufgliederung der Vorgänge während der zellulären Hämostase in Vasokonstriktion, Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation impliziert bereits die durch Rudolph Virchow im 19. Jahrhundert vorgestellten Pathomechanismen der Blutgerinnung. Dem deutschen Pathologen wird zumindest zugeschrieben, die nach ihm benannte Trias der relevanten Einflussfaktoren auf die Blutgerinnung formuliert zu haben: Strömung bzw. Stase, Wandbeschaffenheit, Blutzusammensetzung. [4]

Moderne Forschungsergebnisse legen nahe, dass diese Erkenntnisse im Grundsatz richtig sind. Wird das komplexe Mosaik aus neuen Daten zu einem großen Bild zusammengesetzt, ergeben sich weitere Erkenntnisse. [5] Anfang der 2000er Jahre ersetzte das zellbasierte Gerinnungsmodell das klassische Kaskadenmodell. [6] *Tissue factor* tragende Zellen aktivieren Thrombozyten und gerinnungsfördernde Kofaktoren und bilden die Basis für die massive Thrombingenerierung auf der Plättchenoberfläche, die die Gerinnselbildung propagiert. Die Verbindung der Verletzungsstelle über Kollagen/ von Willebrand Faktor (VWF) mit aktivierten Thrombozyten, die den *tissue factor* tragen, lokalisiert die Thrombingenerierung am benötigten Ort. Für eine effektive Regulation der Gerinnselbildung spielt dabei die Thrombingenerierungsrate und nicht die maximale Thrombinkonzentration eine entscheidende Rolle. [3] Daraus folgend erscheint es sinnvoll, auch das Modell der zellulären Hämostase zu erneuern und die Mikroumgebung um eine Gefäßverletzung und die initiale Anlagerung von Thrombozyten genauer zu betrachten und zu beschreiben. Ähnliche Konzepte sind beispielsweise bei Inflammation oder Tumorgenese bereits bekannt. [7] Seit

Jahren werden zur unspezifischen Immunabwehr *neutrophil extracellular traps* erforscht. Im Rahmen der Sars-Cov-2 Pandemie gibt es Erkenntnisse über endotheliale Dysfunktion und Immunothrombose, die Hinweise bieten, dass auch dort ultragroßer VWF relevant sein könnte. [8]

Ein wichtiges physiologisches Konzept stellt das Mikromilieu in einem eng umgrenzten Raum dar, in dem andere Bedingungen herrschen als in der Umgebung. Dadurch können spezifische Reaktionen gezielt und kontrolliert ablaufen. [9] Der VWF mit der Sekretion seiner ultragroßen Multimeren spielt in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle an der verletzten Gefäßwand.

6.1 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen qualitative und quantitative Aspekte des von Willebrand Faktors untersucht werden. Der Fokus steht dabei auf der Analyse der ultragroßen Multimere des von Willebrand Faktors, sowie des thrombozytären von Willebrand Faktors. Durch den *in vitro* Einsatz eines rekombinanten von Willebrand Faktor Präparats soll die Relevanz der ultragroßen Multimere für eine funktionierende zelluläre Hämostase gezeigt werden. Für das verwendete POCT Gerät soll ein möglichen Einsatz in der Therapieüberwachung des schweren von Willebrand Syndroms diskutiert werden. Die Thrombozyten stellen ein relevantes Reservoir insbesondere auch ultrahochmolekularen von Willebrand Faktors dar. In einem weiteren Schritt soll eine qualitative und quantitative Aufbereitung und Auswertung des thrombozytären von Willebrand Faktors erfolgen. Da dessen Analyse kein gängiges laborchemisches Routineverfahren ist, sollen zusätzlich mögliche standardisierte Darstellungen für einen zukünftigen Routineeinsatz erarbeitet werden.

6.2 Theoretischer Hintergrund

6.2.1 Zelluläre Hämostase

Unter physiologischen Bedingungen wird ein kontinuierlicher Blutfluss im Gefäßsystem aufrecht erhalten. Plättchenadhäsion und -aggregation wird verhindert und eine laminare Strömung bei niedrigem Gefäßwiderstand für geringe Scherkräfte wird gewährleistet, indem Endothelzellen Substanzen wie Stickstoffmonoxid und Prostacyclin produzieren. Bei einer Störung der homogenen Integrität des Gefäßendothels stoppt die Ausschüttung dieser Mediatoren und die autoantikoagulatorische Wirkung der Gefäßwand wird aufgehoben. Hinzu kommen die prokoagulatorischen Signale der geschädigten Intima und extrazellulären Matrix und in der Folge können Thrombozyten adhären. [10] Die Adhäsion wird über Endothel- und Plättchenrezeptoren gesteuert und durch Plasmaproteine wie VWF und Fibrinogen vermittelt. Aggregation und Akkumulation zum Plättchenthrombus, der zum primären Verschluss führt, folgt mit Aktivierung der Plättchen und Ausschüttung weiterer prokoagulatorischer Substanzen aus den Granula der Thrombozyten. [11]

Es zirkulieren 150 bis 450 Thrombozyten pro Nanoliter Blut im gesunden menschlichen Körper. Auf der Oberfläche des ruhenden Plättchens sind zahlreiche Glykoproteine (GP) lokalisiert. Sie dienen als Bindungsstellen für Kollagen (z.B. GP VI), VWF (z.B. GP Ib-V-IX) oder Fibrinogen (z.B. inaktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und als Rezeptoren, die die Plättchenaktivierung vermitteln (z.B. P_2Y für ADP, PAR1 für Thrombin oder TXA_2 -R für Thromboxan A_2). Thrombozyten besitzen keinen Zellkern für eine *de novo* Proteinbiosynthese, transportieren aber in α - und *dense*-Granula zahlreiche Substanzen mit pro- und antikoagulatorischer Wirkung sowie weiteren Funktionen, die bei Plättchenaktivierung sekretiert werden (siehe

Tabelle 1). Ein wesentlicher Anteil der Ladung fällt auf den VWF, insbesondere dessen ultragroße Multimere. [12] Das offene kanalikuläre System (OCS) stellt unter anderem eine Membranreserve dar, mit der die Oberfläche beim *Spreading* schnell vergrößert und ein Austausch von Rezeptoren bewerkstelligt werden kann. Insbesondere werden über das OCS auch Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bereitgestellt. [13]

Tabelle 1: Inhalt der Plättchengranula. Übersicht der Hauptbestandteile in α - und δ -Granula der Plättchen. [12]

| α -Granula | δ -/ dense-Granula |
|---|--|
| Membranproteine: α Ib β 3, GP Ib-V-IX, GP VI, P-Selectin | Nukleotide: ADP, ATP, etc. |
| pro-/ antikoagulatorische und fibrinolytische Proteine | Serotonin |
| Adhäsionsproteine: Fibrinogen, VWF, Thrombospondin | Histamin |
| Chemokine | Polyphosphat, Pyrophosphat |
| Wachstumsfaktoren | Kationen: Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ |
| Gefäßfaktoren und -inhibitoren | |
| Immunmediatoren | |
| Antimikrobielle Peptide | |

An freiliegenden Kollagenfasern der extrazellulären Matrix an einer Gefäßläsion bindet VWF, wird dabei elongiert und dessen Bindestellen aktiviert. Mithilfe schneller Fangbindungen über GP Ib α Plättchenrezeptoren werden noch ruhende Thrombozyten wie mit einer Fangleine aus dem Blutstrom heruntergebremst (*tethering and rolling*). GP VI Rezeptoren stabilisieren die Adhäsion am Kollagen und bewirken die Aktivierung des Thrombozyten. In der Folge wird das Zytoskelett aufgelöst und neuformiert. Bei diesem *shape change* wird die Oberfläche durch die Ausbreitung von Filopodien gespeist aus den Membranvorräten des OCS vergrößert (*spreading*) und zusätzliche Fibrinrezeptoren α Ib β 3 auf der Zelloberfläche verteilt und aktiviert. Die Granula werden in der Plättchenmitte konzentriert und durch Verschmelzung mit dem OCS degranulieren die Plättchen. Aufgrund der Freisetzung der prokoagulatorischen Substanzen aus den Plättchengranula werden Adhäsion, Aktivierung und Akkumulation von Thrombozyten beschleunigt. Die Plättchen-Plättchen Bindungen werden insbesondere über Integrin α Ib β 3 und Fibrinogen vermittelt. [14] Abbildung 1 illustriert die Vorgänge.

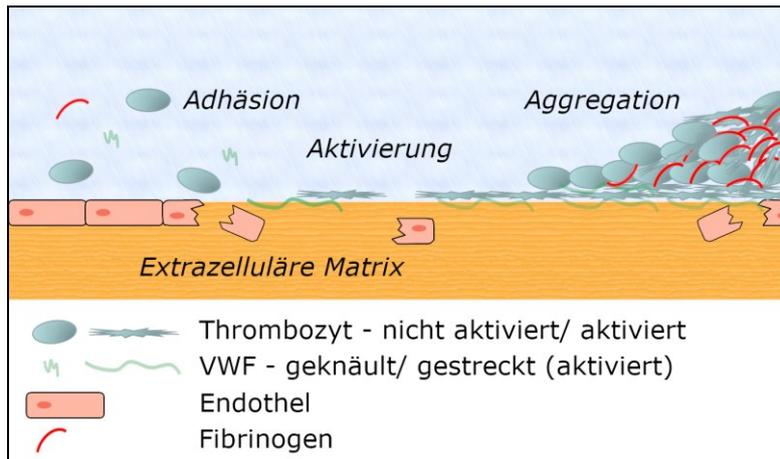


Abbildung 1: primäre Hämostase – Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. An einer Endothelläsion kommen Kollagene der extrazellulären Matrix in Kontakt mit dem Blutstrom, der nicht aktivierte Thrombozyten, VWF und Fibrinogen mitführt. Am Kollagen lagert sich VWF an und wird durch Streckung aktiviert. Daran binden nicht aktivierte Thrombozyten und werden aktiviert. Durch die Bindung von VWF und Fibrinogen an Plättchenrezeptoren aggregieren weitere Thrombozyten und bilden den lockeren Plättchenthrombus, der einen ersten schnellen Verschluss der Verletzung bewirkt. (nach Abbildungen aus Yau et al. [10])

Das komplexeste Protein der primären Hämostase stellt der VWF dar, das in seiner multimeren Struktur biochemische und biomechanische Eigenschaften vereint. Die Vielzahl an unterschiedlichen Bindestellen, funktionellen sterischen Konformationen und die Größenverteilung der einzelnen Multimere tragen zur Funktionalität des VWF bei. Ultragroße Multimere des VWF können die stärkste Aktivität unter besonders schwierigen strömungsmechanischen Bedingungen in Verbindung mit Thrombozyten entwickeln. Bei angeborenen oder erworbenen qualitativen wie quantitativen Defekten des Proteins können leichte bis schwere Formen des Willebrand-Jürgens-Syndroms die Folge sein. [15, 16]

6.2.2 Von Willebrand Syndrom

Die häufigste angeborene Gerinnungsstörung ist das Willebrand-Jürgens- oder von Willebrand Syndrom (VWD). Erstmals 1926 beschrieb Erik von Willebrand diese Erkrankung bei einer Großfamilie auf den Åland Inseln im Bottnischen Meerbusen in der Ostsee zwischen Schweden und Finnland als Pseudohämophilie. [17] Inzwischen sind die molekulargenetischen Zusammenhänge bekannt, die zu unterschiedlichen Ausprägungen der Erkrankung führen können. Mutationen auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 bewirken qualitative oder quantitative Veränderungen des VWF Proteins, die zu verstärkter Blutungsneigung führen. Diagnoserelevante Symptome werden durch das *Bleeding Assessment Tool* der *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH BAT) erfasst, das die Bewertung von Nasenbluten, Hämatomen, Blutungen aus kleineren Wunden, Zahnfleischbluten, gastrointestinale Blutungen, Operationen, Zahnextraktion, Menorrhagien, post-partum Blutungen, Muskelblutungen, Hämarthrose und andere Blutungsprobleme beinhaltet. Die Einteilung in die häufigsten Subtypen 1, 2A, 2B, 2M, 2N und 3 des VWD erfolgt anhand der phänotypischen Ausprägung des VWF Proteins, weil hierfür in der Breite verwendete Labortests zur Verfügung stehen. [18-20] Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den VWD Subtypen.

Tabelle 2: Übersicht der Subtypen des VWDs [18]

| Subtyp | Phänotyp |
|--------|---|
| 1 | Teilweise quantitativ reduzierter VWF |
| 2 | Qualitative VWF Defekte |
| 2A | Reduzierte VWF-abhängige Plättchenadhäsion und selektive Reduktion der hochmolekularen VWF Multimere |
| 2B | Erhöhte Affinität für Plättchenrezeptor GP Ib _α |
| 2M | Reduzierte VWF-abhängige Plättchenadhäsion ohne selektive Reduktion der hochmolekularen VWF Multimere |
| 2N | Deutlich reduzierte Bindungsaffinität zu Faktor VIII |
| 3 | Vollständiger VWF Mangel |

Bei Verdacht auf ein VWD werden standardmäßig die aPTT und Blutungszeit oder Verschlusszeit im PFA (*platelet function analyzer*) bestimmt. Weiterführende Diagnostik beinhaltet die Bestimmung der Faktor VIII Aktivität, des VWF Antigens und VWF

Aktivitäten zu GP Iba Bindung (VWF:RCo, VWF:GP1b) oder Kollagenbindung (VWF:CB). In unklaren Fällen können zur Differenzierung zusätzlich Multimerenanalysen mittels Gelelektrophorese und molekulargenetische Analysen durchgeführt oder die Faktor VIII Bindungsaktivität (VWF:FVIII B) ermittelt werden. [19, 21] Manchmal kann die besonders aufwendige und wenig standardisierte Extraktion und Analyse des *platelet-derived* VWF zielführend sein. [22] Für eine gute Behandlung ist die korrekte Subtypisierung relevant. Patienten mit leichten Blutungen und vor allem Schleimhautblutungen können häufig alleine mit Antifibrinolytika (Tranexamsäure[®]) ausreichend behandelt werden. Zur kurzfristigen Mobilisation endogener VWF Speicher kann Desmopressin (Minirin[®]) eingesetzt werden, wenn sich der Subtyp dazu eignet. In schweren Fällen und bei hohem Blutungsrisiko kann eine prophylaktische oder bedarfsorientierte Substitution von VWF-haltigen Konzentraten erfolgen. [23] Es stehen Plasmapräparate mit unterschiedlichem Faktor VIII Anteil und inzwischen ein rekombinant hergestellter VWF zur Verfügung. Im Gegensatz zu den Plasmaprodukten enthält der rekombinante Faktor insbesondere auch ultragroße VWF Multimere (ULVWF). [24]

6.2.3 Relevanz der ultragroßen VWF Multimere

Im Blutplasma liegt der von Willebrand Faktor in multimerer Verteilung bis über 22ermere vor. Die drei Hauptdomänen VWA, VWC und VWD kommen mehrfach leicht abgewandelt mit jeweils spezifischer Funktion im Monomer vor. Während VWC und VWD Domänen vor allem starre, strukturgebende Funktionen innerhalb der tertiär und quartär Struktur des Proteins aufweisen, besitzen die VWA Domänen eine dynamische Komponente. [25] Letztere beinhalten versteckte Bindungsstellen, die durch Streckung/Konformationsänderung freigelegt und aktiviert werden können. Unter wechselnden chemischen, strömungsphysikalischen und bindungstechnischen Bedingungen nehmen die Domänen unterschiedliche sterische Konformationen ein, wodurch eine Aktivitätsregulierung stattfindet. [26] Abbildung 2 gibt eine Übersicht der relevantesten Domänen und Bindungsstellen eines VWF Monomers.

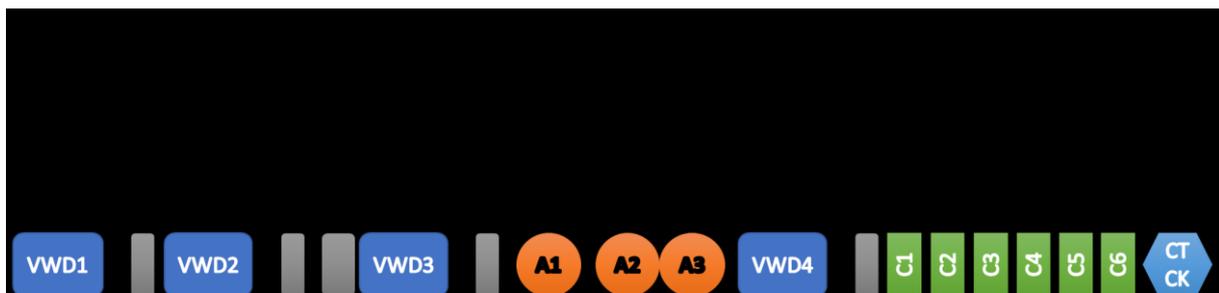


Abbildung 2: VWF Monomer; das VWF Monomer wird im Golgiapparat synthetisiert und beim Transport in die Weibel-Palade-Körperchen oder α -Granula das Propeptid durch Furin zwischen D2 und D'D3 abgespalten. Die Dimerisierung erfolgt über Disulfidbindungen am CTCK Ende, während die Multimerisierung am D'D3 Ende stattfindet. In der Zwischenzeit wurden die klassischen A, C und D Domänen weiter differenziert. Die Unterdomänen (schwarz und grau) von VWD1-4 haben einen hohen Anteil Cystein und bilden daher viele intramolekulare Disulfidbrücken aus, sodass Laschen in der Quartärstruktur entstehen. VWC1-6 Domänen besitzen ebenfalls Disulfidbrücken, die einen langen Stiel bilden. Die globuläre Struktur der VWA1-3 Domänen wird dagegen durch einen hydrophoben Kern generiert. Bindungspartner an D'D3 sind Faktor VIII, an A1 Plättchenrezeptor GP Ib $_{\alpha}$, an A2 Schnittstelle für ADAMTS13, an A3 Kollegen und an die RGD Sequenz in C4 Plättchenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. (vereinfacht nach einer Abbildung aus Zhou et al. [25])

Die dichteste Packung des VWFs besteht im Weibel-Palade-Körperchen (WPK) des Endothels und den α -Granula der Thrombozyten, in denen der VWF nach der Synthese gelagert wird. Schwimmt er im Blutstrom besteht eine weniger dichte aber kollabierte Form, in der die Bindungsstellen versteckt und inaktiv sind. Der Übergang von dichtester Packung zu kollabierter Form geschieht über die gestreckte Form nach der Sekretion. [27] Bei physikalischer Scherung z.B. durch Strömung erfolgt eine reversible Streckung, wodurch Bindungsstellen freigelegt und aktiviert werden. Je länger das Protein ist, desto geringere Kräfte sind zur Entfaltung notwendig und je höher die Kräfte werden, desto stärker wird der

VWF entfaltet. [28] Es sind je nach Domäne mehrere Entfaltungsstufen möglich. Auch das Binden an Plättchenrezeptoren oder ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13*) kann zu weiteren sterischen Aktivierungen führen. [29] Die frisch ausgeschütteten ultragroßen Multimere des VWF weisen somit die potentiell höchste Aktivität auf, sind am leichtesten zu aktivieren und können gleichzeitig am schnellsten degradiert werden. Die Rückfaltung in die geschlossene Stereometrie geschieht dann je nach Domäne zeitlich unterschiedlich schnell. [30]

Binden Thrombozyten an VWF, werden die Scherkräfte am VWF deutlich gesteigert, die zu dessen Entfaltung führen. Unter extremen Scherraten über 10.000 s^{-1} können bei Anwesenheit von ULVWF zunächst reversibel Plättchen-VWF-Konglomerate entstehen. Die Rekrutierung dieser großen Thrombozytenmengen geschieht bei noch inaktivierten Plättchen über den GP Ib $_{\alpha}$ Rezeptor. Eine anschließende Aktivierung der Thrombozyten setzt lokal hohe Konzentrationen gerinnungsfördernder und Plättchen aktivierender Substanzen, inklusive ULVWF, frei. [16, 31] Letztere werden innerhalb von Minuten im Blutstrom durch ADAMTS13 wieder geschnitten und können dann kaum mehr Konglomerate bilden. [31]

Die physiologische Relevanz der ULVWF konnte in *in vitro* Untersuchungen mit VWF defizientem Blut im Sinne einer schweren VWD gezeigt werden. Blut, das unter 10% VWF:Ag und keinen hochmolekularen VWF enthielt, wurde in der Flusskammer und der POCT Messmethode PFA-200[®] über eine Kollagenoberfläche perfundiert. Erst nach Zugabe von ULVWF wurde Aggregatbildung in der Flusskammer bzw. ein Kapillarverschluss im PFA beobachtet. Ein geringer Anteil ULVWF führte bereits zu einer Veränderung der Ergebnisse hin zu einem entsprechenden gerinnungsgesunden Vergleichskollektivs. [31]

6.2.4 Mikroumgebung

Die moderne Trauma- und Inflammationsforschung kann etliche auftretende hämorrhagische Phänomene nicht mehr nur mit dem einfachen Modell der zellulären Hämostase erklären. Es wurden weitere Mechanismen der Gerinnungsaktivierung, Zellkommunikation und Relevanz der ULVWF aufgedeckt. Insbesondere Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α spielen eine wichtige Rolle. [32] Zusätzliches Verständnis kann gewonnen werden, wenn der Ort einer Gefäßverletzung als Mikroumgebung beschrieben wird. Sie unterscheidet sich vom umgebenden Blutstrom in ihrer Zusammensetzung, erfährt eine sowohl örtliche als auch zeitliche enge Begrenzung und bietet die Möglichkeit, die Abläufe an der Läsion anders zu bewerten.

Das Thema einer schnellen Rekrutierung von Thrombozyten zeigt sich, wenn Patienten mit extrem niedrigen Thrombozytenzahlen unter $5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ anfangen spontan schwer zu bluten. Ohne relevantes Trauma entstehen täglich Mikroendothelläsionen, die zur Wahrung der Integrität des vaskulären Systems repariert werden müssen. [33] Tritt eine Mikroläsion auf, werden die angrenzenden Endothelzellen aktiviert und WPK transportieren ihren VWF an die Zelloberfläche. [34]

Im WPK und den α -Granula liegt VWF 100-fach kompaktiert im Vergleich zur elongierten Form vor. Diese besonders dichte Packung des VWFs in seiner Speicherform begründet sich in einer speziellen sterischen Konformation im sauren Milieu bei pH 5,5. Ändert sich der pH bei Sekretion zu neutralen 7,4 im Blutplasma, lösen intramolekulare Kräfte die Stereometrie auf und über die elongierte Form wird die inaktive kollabierte Form des VWF erreicht. [35] Die explosionsartige Freisetzung bei Fusion des WPK mit der Zellmembran führt zu einer konzentrierten VWF Wolke über der Endothelzelle, die mithilfe von gleichzeitig sezerniertem P-Selektin an der Zelle verankert wird. [36] Die hochaktiven elongierten, ultragroßen VWF Multimere binden an GP Ib_α Rezeptoren und fangen wie herausgeschossene Fangseile die Plättchen aus dem Blutstrom (*catch bond*; Fangbindung). [37] Diese schnelle Fangbindung weist eine hohe Affinität und Kraft, dafür eine kurze Dauer auf. Aufgrund einer gleichgewichtsgesteuerten Konformationsänderung am Plättchenrezeptor GP Ib_α entsteht eine *slip bond* (Rutschbindung), die schwächer aber langlebiger ist. [38, 39] Das Plättchen kann in die Läsion rollen und rutschen, am Kollagen binden und aktiviert werden. [40, 41] Bei der Aktivierung des Thrombozyten kommt es zum *shape change*, der eine enorme Vergrößerung der Plättchenoberfläche und einen Transport von Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ an die Oberfläche bedeutet. Zusätzlich kommt es zur Degranulation. [41] Hohe Konzentrationen *platelet-derived* VWF

werden freigesetzt. Affeld et al. [42] simulierten die Ausbreitung durch Diffusion eines durch einen Thrombozyten sezernierten Stoffs im Blutstrom (siehe Abbildung 3). Entsprechend breitet sich der *platelet-derived* VWF in einer dichten Wolke um das Plättchen aus und der Effekt der initialen VWF Sezernierung der Endothelzelle wird vervielfacht. Über der Läsion entsteht eine Art Glocke aus ultrahochmolekularem endothelialelem und *platelet-derived* VWF. [43]

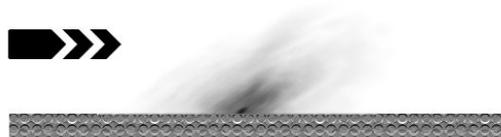


Abbildung 3: Diffusion sekretierter Teilchen im Blutstrom. Affeld et al. simulierten die diffusive Ausbreitung in Kombination mit der Konvektion des Blutstroms (schwarze Pfeile) von ADP, das von einem adhären Plättchen bei Degranulation freigesetzt wurde. Da die gleichen Gesetze der Thermodynamik für alle gelösten Teilchen gelten, kann ähnliches Verhalten für den von Thrombozyten freigesetzten VWF angenommen werden. Die konzentrierte Wolke um das Plättchen verdünnt sich mit Abstand zum Plättchen und die Teilchen breiten sich entsprechend der Fickschen Gesetze nach außen aus. Durch die Konvektion verschiebt sich die konzentrische Ausbreitung. (nach einer Abbildung aus Affeld et al. [42])

Die Strömungsbedingungen im Blutgefäß und die Strömungseigenschaften der Blutzellen führen zur Axialmigration der Blutzellen entlang des Gefäßquerschnitts. Die Erythrozyten konzentrieren sich in der Lumenmitte, während die Thrombozyten an den Gefäßrand verlagert werden. [44] Im so genannten zellfreien Plasmasaum entlang der Gefäßwand ergibt sich eine vielfach höhere Plättchenkonzentration als im Durchschnitt des Vollblutes. [45] Innerhalb der oben beschriebenen, schnell entstehenden VWF Glocke werden die bereits präsenten Plättchen eingeschlossen und an der Läsion fixiert. Es gibt Hinweise, dass auch bereits innerhalb dieses geringen Zeitrahmens Plättchenretraktion eine Rolle spielen könnte. [46]

Eine Limitation und Regulation der Reaktion wird sowohl physikalisch als auch biochemisch erreicht. Da die Diffusionsgeschwindigkeit im Quadrat zum Abstand zur Quelle der höchsten Konzentration abnimmt [47], verdünnt sich die Konzentration ultrahochmolekularer VWF Moleküle radial [42]. Des Weiteren bestehen Bindungen von VWF an membranständigem P-Selectin [40] und intermolekulare Bindungen [31], die eine ungebremste diffusive Ausbreitung reduzieren. Konvektion im Blutstrom bringt eine zusätzliche zügige Verdünnung hochreaktiver Moleküle. Die enzymatische Spaltung des VWF in kleinere, weniger aktive Fragmente erfolgt durch ADAMTS13 [48] im Blut, wobei nur das elongierte Molekül geschnitten werden kann. Das stets aktive ADAMTS13 bindet und schneidet an der VWA2 Domäne und wird durch eine zusätzliche Bindung am benachbarten VWD4 allosterisch

verändert, wodurch seine enzymatische Aktivität um das 9-fache gesteigert wird. [49] Dagegen reduziert die VWA1 Domäne die ADAMTS13 Aktivität um das 10-fache, solange kein GP 1b α daran bindet, also die Abwesenheit eines gebundenen Plättchens. [50] Thrombozyten bringen ihrerseits ADAMTS13 mit und sezernieren diesen gemeinsam mit dem VWF. [51] Innerhalb von Minuten werden im Blutstrom ULVWF degradiert, so dass die Akkumulation großer VWF-Plättchen-Konglomerate nicht mehr möglich ist. [31] Mithilfe der genannten Mechanismen wird die Etablierung einer thrombogenen Mikroumgebung zur schnellen Rekrutierung von Thrombozyten und Versiegelung der Läsion beschrieben, die sich auf einen Umkreis weniger Endothelzellen beschränkt. Die zeitliche Abfolge vom Aufbau bis zur Terminierung der Mikroumgebung wird über verschiedene Zeitreaktionen und Bindungsaffinitäten eng abgestimmt und erstreckt sich über Millisekunden bis Sekunden. Die besondere Relevanz dieser regulatorischen Abläufe zeigt sich auch in der Tatsache, dass diese Mechanismen evolutionär über unterschiedliche Spezies hinweg stark konserviert wurden. [52]

6.3 Eigene Arbeiten

Zunächst wurde anhand von Literaturdaten das VWF fokussierte Modell der Mikroumgebung für die zelluläre Hämostase aufgestellt. Die ultragroßen VWF Multimere aus Endothel und Plättchen spielen hierbei eine zentrale Rolle, sowie deren örtliche und zeitliche Regulation. Im Anhang findet sich eine mögliche didaktische Aufarbeitung.

Da moderne, rekombinant hergestellte VWF Präparate für die Behandlung des schweren VWD im Gegensatz zu Plasmapräparaten ultragroße VWF Multimere enthalten, wurde dann eine Option zur Therapieüberwachung mittels POCT entwickelt. Im Jahr 2018 wurde erstmals ein rekombinant hergestelltes VWF Präparat (Veyvondi®) in Europa zugelassen. Die Therapieüberwachung konnte bis dahin nur klinisch und durch aufwendige Faktoranalyse im Labor erfolgen. In Projekt 1 wurde gezeigt werden, dass mit dem POCT Gerät PFA-200® eine sensitive und spezifische Erfassung von ULVWF und damit eine bessere Beurteilung der zellulären Hämostase und der Therapie eines schweren VWD möglich ist.

Im nächsten Schritt wurde dann eine Möglichkeit zur Extraktion und Bewertung des thrombozytären VWFs entwickelt. Während der endotheliale VWF für eine klinische Beurteilung nicht in seiner Form, kurz nach Sekretion erfasst werden kann, ist es möglich naiven VWF aus Thrombozyten zu isolieren. Da dessen Analyse aufwändig ist, gibt es bis dato keine allgemeingültigen Vereinbarungen zur standardisierten Darstellung. Im Projekt 2 wurde ein Beitrag zur Lösung dieser Problemstellung entworfen und sowohl ein Extraktionsprotokoll entwickelt als auch drei Optionen zur Präsentation der Daten vorgestellt.

Paper 1: Sensitive and specific assessment of recombinant von Willebrand factor in platelet function analyzer

Isabell Pekrul, Thorsten Kragh, Peter L Turecek, Aaron R Novack, Helmut W Ott & Michael Spannagl

DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1420153>

Paper 2: A novel approach to laboratory assessment and reporting of platelet von Willebrand factor

Thorsten Kragh , Isabell Pekrul , Helmut W. Ott , Michael Spannagl & Patrick Möhnle

DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1869715>

6.4 Ausblick

Mithilfe der publizierten Daten aus Projekt 2 wurde der durch das Hamburger Hämophilie Symposium ausgeschriebene Günter Landbeck Excellence Award 2021 zur Finanzierung weiterführender Projekte gewonnen. Der Fokus des vorgestellten Projektvorhabens liegt auf der *Untersuchung des Einflusses von extrakorporaler Zirkulation (EKZ) auf die Konzentration des intrathrombozytären VWFs*. Der Einfluss der EKZ auf den VWF im Blutplasma ist gut untersucht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Einflusses der EKZ auf Thrombozyten waren hinweisend auf eine Depletion der Alpha-Granula. Es ist zu vermuten, dass die Rarefizierung der Alpha-Granula mit einem Verlust von intrathrombozytärem VWF einhergeht. Das primäre Studienziel adressiert die Beschreibung der quantitativen und qualitativen Veränderungen des intrathrombozytären VWF, die sich durch den Einsatz der EKZ ergeben. Desweiteren wurden Projekte initiiert, die andere physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge des intrathrombozytären VWF untersuchen (Blutgruppenabhängigkeit, Inflammationsreaktion).

7 Zusammenfassung

Die primäre Hämostase kann als Abfolge von Thrombozyten und Protein Interaktionen beschrieben werden. Das Zusammenspiel mit dem von Willebrand Faktor (VWF) ist dabei unerlässlich. Um der Komplexität gerecht zu werden, die hinter diesem stark regulierten System steckt, muss die Mikroumgebung um eine Gefäßläsion betrachtet werden. Es spielt die initiale Phase, in der ein zeitlich und räumlich eng begrenztes, hoch thrombogenes Milieu geschaffen wird, eine wichtige Rolle. Es entsteht um Mikroläsionen des Endothels, ist aber kaum durch gängige Messmethoden erfassbar. Durch die Messung einzelner Parameter können dennoch klinisch relevante Rückschlüsse gezogen werden. Die Konzentration und Aktivität des VWF im Plasma sind Routineparameter bei der Beurteilung von Hämostasestörungen. Neben dem plasmatischen VWF ist bekannt, dass der VWF der Thrombozyten – synthetisiert in Megakaryozyten und gespeichert in den α -Granula der zirkulierenden Blutplättchen – zur primären Hämostase und in der Mikroumgebung der Thrombusbildung beiträgt. Der 2018 auch in der EU zugelassene rekombinante VWF (rVWF) Veyvondi® weist die multimere Verteilung von frisch sezerniertem VWF mit ultragroßen (ULVWF) und hochmolekularen Multimeren aus Endothelzellen und Megakaryozyten auf. Er war weder ADAMTS13 noch einem anderen proteolytischen Enzym ausgesetzt. Die Messung der Verschlusszeit (CT) mit dem *Platelet Function Analyzer 200* (PFA-200) erwies sich als hochempfindlich für das Vorhandensein von ULVWF aus zugesetzten VWF-Konzentraten. Als ähnlich naiv wie der rVWF gegenüber Proteolyse stellt sich nur der VWF in Thrombozyten dar. Die laborchemische Bestimmung des *platelet-derived* VWF ist allerdings umständlich und hat sich nicht als Routineparameter durchgesetzt. Es wird daher im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Laborbestimmung und Berichterstattung über den VWF in Thrombozyten vorgeschlagen, die für die Laborroutine und Forschung nützlich sein kann.

Aus der Datenbank der Gerinnungsambulanz des LMU Klinikums wurden 12 Patienten mit diagnostizierter schwerer von-Willebrand-Erkrankung (VWD) ausgewählt. Den Vollblutproben der VWD-Patienten wurden *in vitro* eine therapeutische Dosis des rVWF-Produkts (1 IE/ml) zugesetzt, und die PFA-CTs gemessen. Die PFA-CTs normalisierten sich daraufhin. Darüber hinaus führten steigende Dosierungen von rVWF (0,1; 0,2; 0,5 und 1,0 IE/ml) zu einer dosisabhängigen Verkürzung der PFA-CT. Die *in vitro* Daten zeigen, dass der PFA-200 ein nützliches Instrument zum Nachweis von rVWF ist. Da die PFA-CT-Korrektur dosisabhängig ist, könnte der rVWF Spiegel mit dieser *Point-of-Care* Analysemethode während der Ersatztherapie zuverlässig überwacht werden.

Zur Etablierung einer Methode zur Analyse des *platelet-derived* VWF wurden Thrombozyten aus dem Blut 20 freiwilliger Probanden isolierten. Daraus wurde der *platelet-derived* VWF extrahierter und ergab die Basis für einen Datensatz, mit deren Hilfe drei mögliche Modelle berechnet wurden. Diese Modelle erlaubten es, den *platelet-derived* VWF zu beschreiben als

1. die Konzentration des *platelet-derived* VWF im Vollblut,
2. die Menge des *platelet-derived* VWF in einer Probe mit einer definierten Konzentration von 1000 Thrombozyten pro Nanoliter und
3. die Konzentration des *platelet-derived* VWF in einem einzelnen Thrombozyten.

Die Ergebnisse legen nahe, dass bei gesunden Personen ein Anteil von 10 % der Aktivität des gesamt VWFs im menschlichen Plasma auf den *platelet-derived* VWF entfallen. Die Konzentration des *platelet-derived* VWF wird auf 0,4 IU/ml in einer Probe mit einer definierten Konzentration von 1000 Thrombozyten/nl und auf etwa 42 IU/ml in einem Thrombozyten berechnet (jeweils VWF:Ag).

Die Analyse des *platelet-derived* VWF bleibt methodisch komplex und der Handhabung in spezialisierten Laboren vorbehalten. Dennoch stellt diese und die Detektierbarkeit von ULVWF in VWF-defizientem Blutplasma von Patienten mit schwerer VWD mithilfe eines funktionellen Testgeräts einen Schritt Richtung Beurteilbarkeit der Mikroumgebung dar. Der PFA-200 als eine vollautomatische und zuverlässige Point-of-Care-Methode zur Bewertung der primären Hämostase, kann erheblichen klinischen Nutzen bringen. Eingesetzt zur Überwachung der rVWF-Ersatztherapie bei Patienten mit VWD, bietet er die Möglichkeit, Dosierungen des rVWF zu optimieren und trägt damit zur Patientensicherheit bei. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Vollblutproben von VWD-Patienten, die mit rVWF versetzt wurden, eine Normalisierung im PFA-CT aufwiesen und dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestand.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zur Optimierung der diagnostischen Verfahren hinsichtlich des von Willebrand Faktors beitragen. Somit würden sie einen potentiellen Beitrag zum besseren Verständnis dieses Schlüsselproteins der primären Hämostase leisten.

8 Abstract

Primary hemostasis can be described as a sequence of platelet and protein interactions, in which the interplay with von Willebrand factor (VWF) is essential. To account for the complexity behind this highly regulated system, the microenvironment surrounding a vascular lesion must be considered. In this context, the initial phase, in which a temporally and spatially confined, highly thrombogenic milieu is created, plays an important role. It develops around microlesions of the endothelium, but is hardly detectable by common laboratory methods. Nevertheless, clinically relevant conclusions can be drawn by measuring individual parameters. The concentration and activity of VWF in plasma are routine parameters in the assessment of hemostasis disorders. In addition to VWF in plasma, VWF in platelets, synthesized by megakaryocytes and stored in the α -granules of circulating platelets, is known to contribute to primary hemostasis and in the microenvironment of thrombus formation. Veyvondi®, a recombinant VWF (rVWF), approved in 2018 also in the EU, exhibits the multimeric distribution of freshly secreted VWF with ultralarge (ULVWF) and high molecular weight multimers from endothelial cells and megakaryocytes, as it was not exposed to ADAMTS13 or any other proteolytic enzyme. Closure time (CT) measurement with the Platelet Function Analyzer 200 (PFA-200) was found to be highly sensitive to the presence of ULVWF from added VWF concentrates. Only VWF in platelets was found to be similarly to rVWF naive to proteolysis. However, laboratory determination of platelet-derived VWF is cumbersome and has not gained acceptance as a routine parameter. Therefore, a method for laboratory determination and reporting of VWF in platelets that might be useful for routine laboratory work and research is proposed in this work.

Twelve patients diagnosed with severe von Willebrand disease (VWD) were selected from the database of the Hemophilia Treatment Center of LMU Klinikum. A therapeutic dose of rVWF product (1 IU/ml) was added to the VWD patients' whole blood samples *in vitro*, and PFA-CTs were measured. PFA-CTs subsequently normalized. In addition, increasing doses of rVWF (0.1; 0.2; 0.5 and 1.0 IU/ml) resulted in a dose-dependent shortening of PFA-CTs. The *in vitro* data indicate that the PFA-200 is a useful tool for detecting rVWF. Because PFA-CT reduction is dose-dependent, rVWF levels could be reliably monitored by this point-of-care analysis method during replacement therapy.

To establish a method for analysis of platelet-derived VWF, platelets were isolated from the blood of 20 volunteers. From these, platelet-derived VWF was extracted and provided the

basis for a data set that was used to calculate three alternative models. These models allowed platelet-derived VWF to be described as

1. the concentration of platelet-derived VWF in whole blood,
2. the amount of platelet-derived VWF in a sample with a defined concentration of 1000 platelets per nanolitre, and
3. the concentration of platelet-derived VWF in a single platelet.

The results suggest that in healthy individuals, platelet-derived VWF accounts for 10% of the activity of total VWF in human plasma. The concentration of platelet-derived VWF is calculated to be 0.4 IU/ml in a sample with a defined concentration of 1000 platelets/nl and approximately 42 IU/ml in a platelet (VWF:Ag, respectively).

Analysis of platelet-derived VWF remains methodologically complex and confined to specialized laboratories for handling. Nevertheless, this and the detectability of ULVWF in VWF-deficient plasma from patients with severe VWD using a functional analyzer is a step toward assessability of the microenvironment. The PFA-200, as a fully automated and reliable point-of-care method for assessing primary hemostasis, may provide significant clinical benefit. Used to monitor rVWF replacement therapy in patients with VWD, it provides the ability to monitor and optimize regimens of rVWF, contributing to patient safety. Experimentally, it was shown that whole blood samples from VWD patients spiked with rVWF exhibited normalization in PFA-CT and that a dose-response relationship existed.

The results of this work may contribute to the optimization of diagnostic procedures with regard to von Willebrand factor. Thus, they would potentially provide a contribution to a better understanding of this key protein of primary hemostasis.

9 *In dieser Arbeit kumulierte Publikationen*

Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Originalarbeiten in dieser Version der Dissertation nicht enthalten.

Publikation 1

Sensitive and specific assessment of recombinant von Willebrand factor in platelet function analyser (2017 in *Platelet*)

Isabell Pekrul, Thorsten Kragh, Peter L Turecek, Aaron R Novack, Helmut W Ott & Michael Spannagl

DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1420153>

Publikation 2:

A novel approach to laboratory assessment and reporting of platelet von Willebrand factor (2020 in *Platelets*)

Thorsten Kragh , Isabell Pekrul , Helmut W. Ott , Michael Spannagl & Patrick Möhnle

DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1869715>

10 Literatur

1. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2015. **50**(4).
2. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. Indian Journal of Anaesthesia, 2014. **58**(5).
3. Monroe, D.M. and M. Hoffman, *What does it take to make the perfect clot?* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2006. **26**(1).
4. Wobmann, P., *Albrecht von Haller: der Begründer der modernen Hämodynamik*. Archiv Für Kreislaufforschung, 1967. **52**(1-2).
5. Aria, M.M., A. Erten, and O. Yalcin, *Technology Advancements in Blood Coagulation Measurements for Point-of-Care Diagnostic Testing*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019. **7**.
6. Hoffman, M. and D.M. Monroe, *A cell-based model of hemostasis*. Thrombosis and Haemostasis, 2001. **85**(6).
7. McLean, M.H., et al., *The Inflammatory Microenvironment in Colorectal Neoplasia*. Plos One, 2011. **6**(1).
8. Bonaventura, A., et al., *Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(5).
9. Kim, J. and J.S. Bae, *Metabolic regulation of macrophages in tumor microenvironment*. Current Opinion in Hematology, 2018. **25**(1).
10. Yau, J.W., H. Teoh, and S. Verma, *Endothelial cell control of thrombosis*. Bmc Cardiovascular Disorders, 2015. **15**.
11. Wang, Y., et al., *Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2012. **12**(2).
12. Gremmel, T., A.L. Frelinger, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2016. **42**(3).
13. Selvadurai, M.V. and J.R. Hamilton, *Structure and function of the open canalicular system - the platelet's specialized internal membrane network*. Platelets, 2018. **29**(4).
14. Hosseinzadegan, H. and D.K. Tafti, *Mechanisms of Platelet Activation, Adhesion and Aggregation*. Thromb Haemost Res, 2017. **1**(2).
15. Flood, V.H., *New insights into genotype and phenotype of VWD*. Hematology-American Society of Hematology Education Program, 2014.
16. Reininger, A.J., et al., *Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress*. Blood, 2006. **107**(9).
17. Nichols, W.C. and D. Ginsburg, *von Willebrand disease*. Medicine, 1997. **76**(1).
18. Sadler, J.E., et al., *Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006. **4**(10).
19. Schneppenheim, R., *The pathophysiology of von Willebrand disease: therapeutic implications*. Thrombosis Research, 2011. **128**.
20. Elbatarny, M., et al., *Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project*. Haemophilia, 2014. **20**(6).
21. Lavin, M., et al., *Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying low VWF levels*. Blood, 2017. **130**(21).
22. McGrath, R.T., et al., *Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis*. Blood, 2013. **122**(25).

23. Budde, U., H.J. Metzner, and H.G. Muller, *Comparative analysis and classification of von Willebrand factor/factor VIII concentrates: Impact on treatment of patients with von Willebrand disease*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2006. **32**(6).
24. Peyvandi, F., et al., *Evolution of replacement therapy for von Willebrand disease: From plasma fraction to recombinant von Willebrand factor*. Blood Reviews, 2019. **38**.
25. Zhou, Y.F., et al., *Sequence and structure relationships within von Willebrand factor*. Blood, 2012. **120**(2).
26. Ju, L.N., et al., *Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Ib alpha in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics*. Thrombosis Research, 2015. **136**(3).
27. Lenting, P.J., O.D. Christophe, and C.V. Denis, *von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends*. Blood, 2015. **125**(13).
28. Ruggeri, Z.M., et al., *Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress*. Blood, 2006. **108**(6).
29. Miyata, S., et al., *Conformational changes in the A1 domain of von Willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein Ib alpha*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(15).
30. Xu, A.J. and T.A. Springer, *Calcium stabilizes the von Willebrand factor A2 domain by promoting refolding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(10).
31. Kragh, T., et al., *High Shear Dependent vonWillebrand Factor Self-assembly Fostered by Platelet Interaction and Controlled by ADAMTS13*. Thrombosis Research, 2014. **133**(6).
32. Zeineddin, A., et al., *Role of Von Willebrand Factor after Injury: It May Do More Than We Think*. Shock, 2021. **55**(6).
33. Slichter, S.J., *Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients*. Transfusion Medicine Reviews, 2004. **18**(3).
34. Mourik, M. and J. Eikenboom, *Lifecycle of Weibel-Palade bodies*. Hamostaseologie, 2017. **37**(1).
35. Tiemeier, G.L., et al., *Lowering the increased intracellular pH of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells induces formation of mature Weibel-Palade bodies*. Stem Cells Translational Medicine, 2020. **9**(7).
36. Padilla, A., et al., *P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface*. Blood, 2004. **103**(6).
37. Andrews, R.K. and M.C. Berndt, *Platelet adhesion: a game of catch and release*. Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(9).
38. Auton, M., C. Zhu, and M.A. Cruz, *The Mechanism of VWF-Mediated Platelet GPIb alpha Binding*. Biophysical Journal, 2010. **99**(4).
39. Rakshit, S. and S. Sivasankar, *Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(6).
40. Frenette, P.S., et al., *Platelets Roll on Stimulated Endothelium in-vivo - An Interaction Mediated by Endothelial P-Selectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(16).
41. Pötzsch, B., M.P. Gawaz, and K. Madlener, *Hämostaseologie*. 2010: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
42. Affeld, K., et al., *Fluid Mechanics of the Stagnation Point Flow Chamber and Its Platelet Deposition*. Artificial Organs, 1995. **19**(7).

43. Kanaji, S., et al., *Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(8).
44. Aarts, P., et al., *Blood-Platelets are Concentrated near the Wall and Red Blood-Cells in the Center in Flowing Blood*. Arteriosclerosis, 1988. **8**(6).
45. Chebbi, R., *Dynamics of blood flow: modeling of Fahraeus and Fahraeus-Lindqvist effects using a shear-induced red blood cell migration model*. Journal of Biological Physics, 2018. **44**(4).
46. Kragh, T., et al., *Platelet adhesion, aggregation, and embolism on artificial surfaces in non-parallel blood flow*. Microfluidics and Nanofluidics, 2015. **19**(1).
47. Job, G. and R. Ruffler, *Physikalische Chemie : Eine Einführung nach neuem Konzept mit zahlreichen Experimenten*. 2 ed. Vol. 1. 2021, Wiesbaden, Germany: Springer Spektrum.
48. Levy, G.G., et al., *Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura*. Nature, 2001. **413**(6855).
49. Muia, J., et al., *Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(52).
50. Nishio, K., et al., *Binding of platelet glycoprotein Ib alpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(29).
51. Liu, L., et al., *Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(11).
52. Muia, J., et al., *Phylogenetic and functional analysis of ADAMTS13 identifies highly conserved domains essential for allosteric regulation*. Blood, 2019. **133**(17).

11 Anhang

11.1 Ein didaktisches Werkzeug zur Veranschaulichung der Mikroumgebung

Die Relevanz des ULVWF und dessen Interaktion mit Plättchen und Endothel an der Gefäßläsion können innerhalb der Mikroumgebung verstanden werden. Um die Mikroumgebung in einem vereinfachten, didaktisch greifbaren Bild zu erfassen, wurde eine Analogie zum Zeichentrickhelden Spiderman herangezogen. Die Darstellung soll die in Abschnitt 6.2.4 beschriebenen Zusammenhänge auf einen Blick greifbar machen. Der Comic (Abbildung 4) beinhaltet vereinfachte biochemische, wie fluidmechanische, als auch zelluläre Interaktionen. Er erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit in der Darstellung. Zur besseren Übersicht wurden gewisse Details weggelassen. Abbildung 5 dient der Erläuterung.

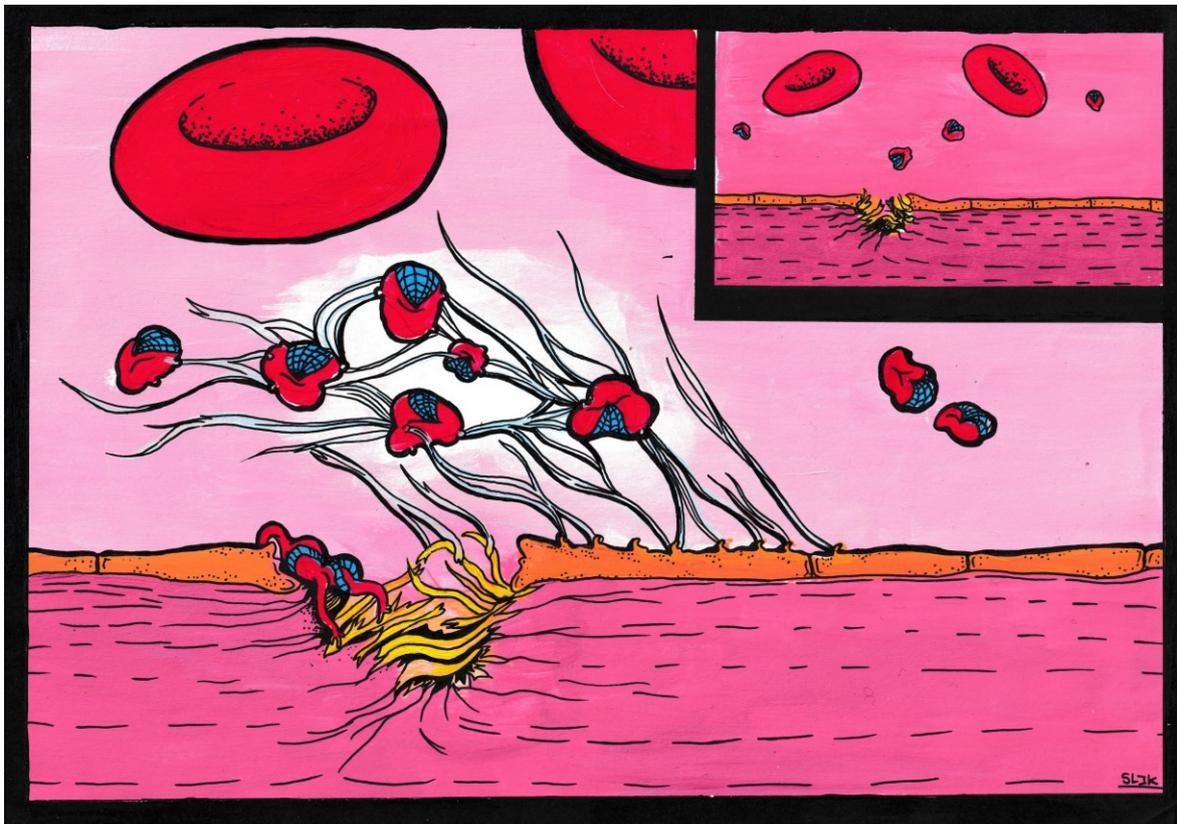


Abbildung 4: Spiderman der primären Hämostase, Comic zur Versinnbildlichung der in 6.2.4 dargelegten komplexen Vorgänge der Mikroumgebung einer Gefäßverletzung. Die Thrombozyten wurden farblich dem Actionhelden Spiderman nachempfunden, die den VWF wie Spinnfäden nutzen, um aus schneller Strömung sofort am Ort der ‚Zerstörung‘ in Aktion treten zu können. Das kleine Bild im Bild oben rechts zeigt die Situation eines VWD Typ 3 Patienten, wenn kein VWF vorhanden ist. Die Flussrichtung besteht von rechts nach links. (gezeichnet von Sara Luiza Joy Krippgans, mit freundlicher Überlassung der Rechte)

11.2 Erläuterung zum Anhang 11.1

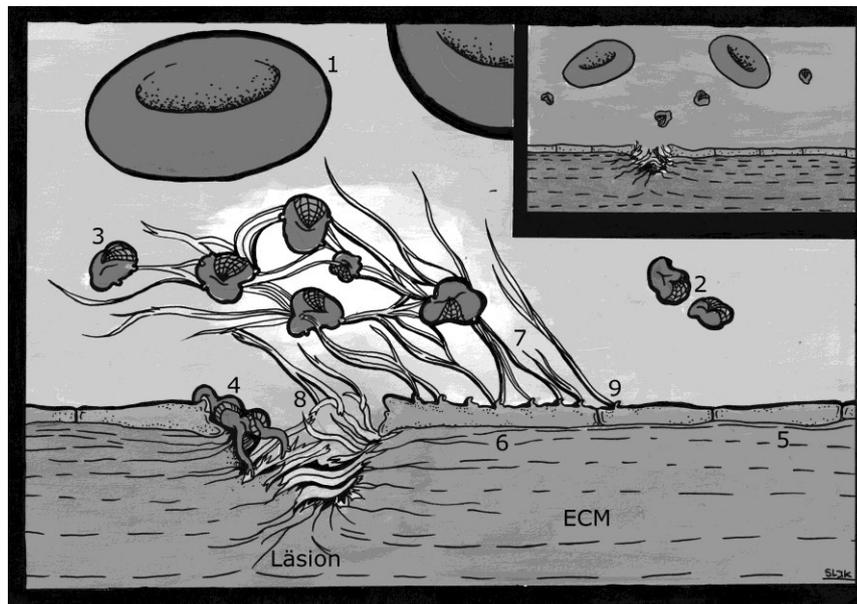


Abbildung 5: Erläuterung zu Abbildung 4: Spiderman der primären Hämostase, 1) Erythrozyt im Blutstrom, 2) Thrombozyt, 3) Thrombozyt über GP1b Rezeptor gebunden an VWF, 4) aktivierter Thrombozyt adhären an Kollagenfasern der extrazellulären Matrix (ECM), 5) Endothelzelle, 6) aktivierte Endothelzelle, 7) ultralarge VWF, 8) VWF gebunden an Kollagen, 9) P-Selektin

Endothel besitzt physiologischer Weise antithrombogene Eigenschaften. Entsteht jedoch eine Läsion zwischen den kohärent wachsenden Endothelzellen (5), wird thrombogenes Material aus der darunter liegenden extrazellulären Matrix (ECM), vor allem Kollagenfasern, dem Blutstrom präsentiert. Die Oberflächeneigenschaften der angrenzenden Endothelzellen ändern sich. Durch die Aktivierung (6) gelangen ULVWF und P-Selektin (7+9) an die Zelloberfläche. Zwischen Blutstrom (1) und Endothel schwimmen im Plasmasaum Thrombozyten (2). Im nicht-aktivierten Zustand sind vor allem GP 1b_α Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsent, die immer aktiv sind. Kommen sie in den Bereich einer Endothelläsion, bindet GP 1b_α an der VWF Wolke der Endothelzellen (3) über Fangbindungen und können ihrerseits noch ULVWF in die VWF Wolke beisteuern, der auch am Kollagen bindet (8). Plättchen adhären (4) schließlich am Kollagen, werden dort aktiviert und führen zum Verschluss der Läsion.

12 Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Spannagl bedanke ich für sein langjähriges Vertrauen in meine Arbeit und die Unterstützung, die ich auch für meine zweite Dissertation bekommen habe.

PD Dr. Patrick Möhnle und Dr. Isabell Pekrul gilt mein Dank besonders für die stetige Hilfe und Diskussionen bei der Publikation der durchgeführten Projekte.

Bei Dr. Helmut Ott möchte ich mich vor allem für die Multimerenanalysen bedanken, bei denen er immer wieder meinen ungewöhnlichen Gedankengängen Rechnung getragen hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Kommilitonin Sara Luiza Joy Krippgans, die sich an die großartige künstlerische Ausgestaltung meiner Gedanken zur primären Hämostase gewagt hat.

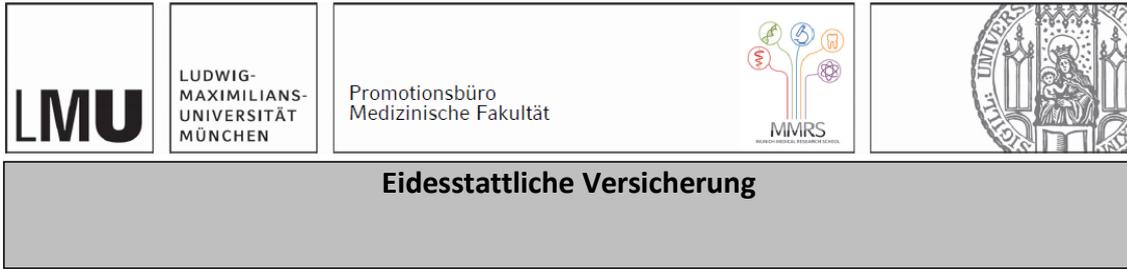
Ich will Michaela Müller und dem gesamten Team der Gerinnungsambulanz des LMU Klinikums München meinen großen Dank aussprechen, die meine Ideen und experimentellen Ansätze immer mitgetragen und gemeinsam mit mir herumprobiert haben.

All den freiwilligen Blutspendern danke ich für ihren Einsatz, mir immer wieder ihr wertvolles Lebenselixier zur Verfügung zu stellen.

Ich bedanke mich bei allen, die ansonsten noch in irgendeiner Weise am Zustandekommen dieses Werks geholfen haben, insbesondere wenn es um immer wiederkehrendes Korrekturlesen ging.

Last but not least danke ich meiner lieben Freundin Angelika Ebel, ohne deren mühevollen Unterstützung, nächtelange Diskussionen und seelischen Beistand diese Arbeit nie zu einem Ende gekommen wäre.

13 Affidavit



Dr. Kragh, Thorsten

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Relevanz des ultragroßen und thrombozytären von Willebrand Faktors für die primäre Hämostase und in der Diagnostik des von Willebrand Syndroms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10.06.2023

Ort, Datum

Thorsten Kragh

Unterschrift Doktorand