Ex-vivo-Untersuchung des von-Willebrand-Faktor-Traffickings nach Interaktion mit Neutrophilen und dessen Auswirkungen auf die Neutrophilenfunktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Alua Kuanyshbek

aus Almaty/Kasachstan

2026

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Kurts

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2026

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	**Deutsche Zusammenfassung**	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	16
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
2.	**Veröffentlichung**	28
3.	**Erklärung zum Eigenanteil**	29
4.	**Danksagung**	30

Abkürzungsverzeichnis

AO	Acridinorange
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	Cluster of differentiation
CXCL-1	CXC-Motiv-Chemokin Ligand 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Da	Dalton
ECFC	Endothel-Kolonie-formende Zellen (endothelial colony forming cells)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EEA1	Early endosome antigen 1
FBS	Fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
g	Erdbeschleunigung (Standardwert: 9,81 m/s²)
HEK93T Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
IF	Immunfluoreszenz
IL-8	Interleukin-8
Mac-1	Makrophagen-1 Antigen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Min	Minuten
MIV	Mittlerer Intensitätswert (mean intensity value)
NET	Extrazelluläre Fallen der Neutrophile (neutrophil extracellular traps)
NIF	Neutrophil-Hemmungsfaktor (neutrophil inhibitory factor)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
pd	Aus Plasma gewonnen (plasma-derived)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein ligand-1

Rab7	Protein aus der Rab (Ras-related in brain)-Familie der Ras-ähnlichen GTPasen 7
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rVWF	Rekombinanter VWF
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
TNFα	Tumornekrose-Faktor α
VWF	Von-Willebrand-Faktor
VWF:Ag	VWF-Antigen
VWS	Von-Willebrand-Syndrom
WPK	Weibel-Palade-Körper

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Der Von-Willebrand-Faktor (VWF) ist ein wichtiger Bestandteil des Blutplasmas, der vor allem für seine Rolle in der Blutgerinnung bekannt ist (Löf et al., 2018; Luo et al., 2012; Peyvandi et al., 2011). VWF spielt sowohl bei der primären (zellulären) als auch bei der sekundären (plasmatischen) Hämostase eine Rolle, indem es an das Kollagen der verletzten Gefäßwand bindet und die Adhäsion sowie Aggregation von Blutplättchen fördert (James und Goodeve, 2011). Zudem ist es ein Trägerprotein für Faktor VIII, der wiederum eine der Hauptfunktionen in der plasmatischen Gerinnung erfüllt (Luo et al., 2012). Strukturell handelt es sich beim VWF um ein multimeres Glykoprotein (Zhou et al., 2012). Jedes Monomer zeigt eine mosaikförmige Architektur und besteht aus mehreren Domänen, die wie folgt angeordnet sind: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK, wobei es sogenannte strukturelle oder funktionelle Domänen gibt (Kawecki et al., 2017; Springer, 1994). Strukturelle Domänen wie die C-Domänen und CK sind an der Dimerisation und die Domänen D1-D2-D'-D3 an der Multimerisation der VWF-Multimere beteiligt. Die funktionellen Domänen von VWF sind für seine spezifischen Eigenschaften verantwortlich. So bindet die Domäne A1 beispielsweise das Glykoprotein Ib auf Thrombozyten, während die Domänen A1 und A3 das Kollagen der Gefäßwand binden (Keuren et al., 2004; Tischer et al., 2020). Faktor VIII bindet an die Domänen D’ und D3 (SCHNEPPENHEIM und Budde, 2011). VWF wird in den Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert (Lenting et al., 2015). Nach seiner komplexen Biosynthese, die zur Bildung ultragroßer Multimere führt, wird er in den Weibel-Palade-Körpern (WPK) der Endothelzellen und den α-Granula der Thrombozyten gespeichert (Kanaji et al., 2012). Während α-Granula auch ohne VWF gebildet werden können, ist die Bildung der WPK direkt vom Vorhandensein des VWF abhängig (McCormack et al., 2017). Defekte und Defizite im VWF verursachen das Von-Willebrand-Syndrom (VWS) (Leebeek und Eikenboom, 2016). Mutationen im VWF-Gen führen zu verschiedenen pathologischen Varianten des VWF, die entweder quantitativ oder qualitativ verändert sind und die drei Typen des VWS definieren: Typ 1 ist durch eine leichte bis mäßige Verringerung der VWF-Menge gekennzeichnet, bei Typ 2 liegt ein funktioneller Mangel des VWF vor, und bei Typ

3 fehlt der VWF vollständig (James und Lillicrap, 2013; Yadegari et al., 2021). Neuere Studien deuten auf die Mitwirkung des VWF an Entzündungsprozessen (Kawecki et al., 2017). Ein Hinweis auf die Beteiligung des VWF an den Entzündungsreaktionen ist die Tatsache, dass VWF intrazellulär die Bildung von WPK beeinflusst und darin zusammen mit den wichtigsten Entzündungsmediatoren wie Angiopoietin-2, P-Selectin, Interleukin-6, Interleukin-8 sowie CXC-Motiv-Chemokin Ligand 1 (CXCL-1) gespeichert wird (McCormack et al., 2017). Wird das Endothel durch einen Entzündungsreiz stimuliert, setzen die Endothelzellen den Inhalt der WPK frei, die verschiedene bereits erwähnte Proteine enthalten, die den Entzündungsprozess fördern und Leukozyten anziehen. Gleichzeitig wird auch VWF in großem Umfang an den extrazellulären Entzündungsherd freigesetzt (Denis et al., 2001; Petri et al., 2010). Bekanntermaßen ist der VWF das wichtigste Protein, das Brücken zwischen den Thrombozyten und zwischen den Thrombozyten und dem Endothel bildet. Darüber hinaus wurde vermutet und bereits gezeigt, dass der VWF, gebunden an das Subendothel des Gefäßes an der verletzten Stelle, direkt mit den Leukozyten interagieren kann (Denis et al., 2001; Pendu et al., 2006). Der gebundene VWF ist in der Lage, die Leukozyten mit Hilfe von Rezeptoren wie P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und Makrophagen-1 Antigen (Mac-1) (oder αMβ2-Integrin [cluster of differentiation, CD11b/CD18]) zu binden (Pendu et al., 2006). Die Leukozyten binden sich fest an das Endothel, rollen und wandern nach extravasal aus, um dort ihrer Funktion der Erregerabwehr nachzugehen (Springer, 1994). Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass der VWF an Makrophagen, eine bedeutende Zellpopulation der natürlichen Immunabwehr, bindet und dabei deren Funktion beeinflusst (Drakeford et al., 2022). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung und Entfernung von VWF aus dem Plasma spielen (Béguin et al., 2020; O'Sullivan et al., 2018). Das Verstehen der Mechanismen des Abbaus und Entfernung von VWF aus dem Blut ist von hohem klinischem Interesse, um die Wirkungsdauer und Effektivität der therapeutischen VWF-Konzentrate für VWS-Patienten zu verbessern. Yadegari et al. isolierten Neutrophile aus dem Blut eines VWS-Patienten mit einer außergewöhnlich kurzen Halbwertszeit der VWF-Konzentrate und zeigten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, dass die Neutrophile ein VWF-Signal aufwiesen. Dieses Signal war nach der Verabreichung der VWF-Konzentrate signifikant verstärkt (Yadegari et al., 2022b). Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, dass frei

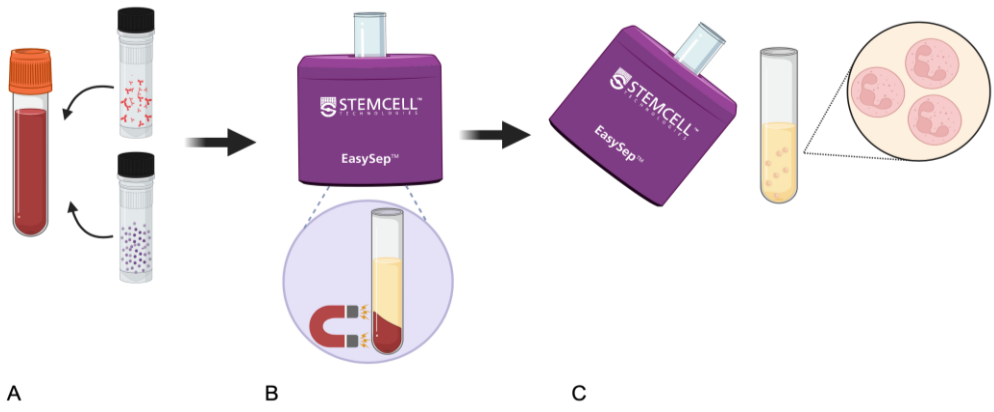
zirkulierender VWF an Neutrophile binden und von diesen internalisiert werden könnte, wobei er möglicherweise die Funktionen der Neutrophile in der angeborenen Immunität beeinflusst. In der vorliegenden Studie hatten wir das Ziel, die Interaktion von zirkulierendem Plasma-VWF mit neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für den Beitrag von VWF zu Entzündungsprozessen zu gewinnen. Dafür wollten wir zunächst die Bindung von VWF an neutrophile Granulozyten unter verschiedenen Bedingungen analysieren, darunter auch Strömungsbedingungen, um den physiologischen Blutfluss nachzuahmen, und aktivierten die Neutrophile durch Entzündungsmediatoren. Darüber hinaus interessierte uns, wie der VWF nach dieser Interaktion weiterverarbeitet wird, welche Auswirkungen diese Interaktion auf die Funktion der Neutrophile hat, sowie ob die Neutrophile eine Rolle bei der Eliminierung von VWF aus dem Plasma spielen.

1.2 Material und Methoden

Isolation von neutrophilen Granulozyten aus peripherem Blut gesunder freiwilliger Spender

Venöses Vollblut wurde von gesunden Personen nach Einholung einer informierten Einwilligung gemäß den Prinzipien der Deklaration von Helsinki abgenommen. Die Freiwilligen hatten keine Erkrankungen, die den VWF oder die Leukozytenfunktion beeinflussen, befanden sich in einem entzündungsfreien und beschwerdefreien Allgemeinzustand und hatten in den 48 Stunden vor der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen. Ca. 5-10 ml Blut wurde nach der Punktion einer peripheren Unterarmvene in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) entnommen. Die neutrophilen Granulozyten wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Vollblut mithilfe des EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit (StemCell Technologies, Deutschland) isoliert, das auf dem Prinzip einer immunmagnetischen negativen Selektion basiert. Unerwünschte Zellen werden mit Antikörpern und magnetischen Partikeln (EasySep™ Direct RapidSpheres™) markiert und mithilfe eines EasySep™-Magneten separiert. Zunächst wurde dem Vollblut ein Isolationscocktail (Antikörpergemisch, das Antikörper gegen basophile und eosinophile Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten enthält) und magnetische Partikel

EasySep™ Direct RapidSpheres™ hinzugefügt. Das Blut wurde bei Raumtemperatur inkubiert (Dissertationsabbildung 1A). Anschliessend wurde ein Medium, bestehend aus phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline, PBS, Gibco, USA) und 1 mM EDTA, hinzugefügt und das Röhrchen in den EasySep™-Magneten platziert (Dissertationsabbildung 1B). Nach mehreren wiederholten Inkubationen des Blutgemisches im Magneten und Übergießen der Suspension in neue Röhrchen erhielten wir eine Zellsuspension, die bis zu 99% reine, isolierte neutrophile Granulozyten enthielt (Dissertationsabbildung 1C). Im Durchschnitt wurden 1,5-3 x 10^6 Zellen/ml Blut isoliert. Die Anzahl und Vitalität der isolierten Zellen wurden mit dem NucleoCounter® NC-202™ (ChemoMetec, Dänemark), einem automatisierten Zellzähler, durch zweifarbige fluoreszierende Färbung bestimmt. Dieser verwendet Acridinorange (AO) und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Identifizierung lebender und toter Zellen. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie, wie im Folgenden beschrieben, beurteilt. Darüber hinaus bestimmten wir nach einer spezifischen Inkubationszeit von bis



Dissertationsabb. 1. Isolation von neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut gesunder Freiwilliger mithilfe des EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

(A) Überführen des abgenommenen Blutes nach Punktion einer peripheren Vene in ein Röhrchen, Zugabe des 1mM EDTA-haltigen PBS-Mediums, des Isolations-Cocktails, und der EasySep™ Direct RapidSpheres™ nach Angaben des Herstellers.

(B) Inkubation des Zellgemisches in einem EasySep™-Magneten, wobei unerwünschte Zellen mit speziellen Antikörpern markiert und anschliessend mit Hilfe der magnetischen Partikel RapidSpheres™ zu den Röhrchenwänden angezogen werden.

(C) Übergießen des fertigen Zellgemisches nach mehreren Inkubationen in ein neues Röhrchen.

zu 180 Minuten (Min) die Zellvitalität unter Verwendung des NucleoCounter® NC-202™ und den Anteil apoptotischer Zellen mit der Durchflusszytometrie durch Bewertung des CD16-Rezeptor-Verlustes.

Durchflusszytometrische Analyse

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach dem Prinzip der Immunfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Nach der Isolation oder der Inkubation wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und in einem Färbepuffer (PBS mit 2 % fetales Rinderserum [fetal bovine serum, FBS] und 2 mM EDTA) resuspendiert, um eine Konzentration von 10^6 Zellen pro 100 µl Puffer zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen mit zwei Antikörper-Sätzen markiert (alle Antikörper hergestellt von Miltenyi Biotec, Deutschland). Diese enthielten entweder fluorochrom-konjugierte Antikörper (anti-CD66b-FITC, anti-CD45-APC und anti-CD16-PE) oder Isotyp-Kontrollen (IgG1-FITC, IgG1-APC und IgG1-PE). Nach der Inkubation mit den Antikörpern für 10 Minuten bei 4 ºC wurden die Zellen mit dem Färbepuffer gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden einer flusszytometrischen Analyse mit dem Navios-Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Deutschland) unterzogen. Die gewonnenen Daten wurden anschließend mit der FlowJo-Software ausgewertet.

Beurteilung der VWF-Bindung an Neutrophile nach Aktivierung durch Entzündungsfaktoren

Nach der Isolierung der Neutrophilen wurden die Zellen in autologem, d.h. eigenem, Plasma (Plasma, das nach Zentrifugation mit 300-faches der Erdbeschleunigung [g] über 5 Min bei Raumtemperatur aus dem Überstand derselben isolierten Zellen gewonnen wurde und VWF des dazugehörigen Plasmas enthält) resuspendiert und in Multi-Well-Platten überführt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (ruhende Zellen) oder mit den folgenden Substanzen in bestimmten Konzentrationen stimuliert: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; Sigma, USA) 10 ng/ml, Tumornekrose-Faktor α (TNFα; Invitrogen, Deutschland) 5 ng/ml, und Interleukin-8 (IL-8; R&D, USA) in Konzentrationen von 0,3 ng/ml, 0,5 ng/ml oder 0,7 ng/ml. Die Stimulation erfolgte über 15 Minuten bei 37

ºC und 5% CO_2. Zusätzlich wurden die Zellen in einem separaten Satz mit einem Neutrophil-Hemmungsfaktor (NIF) in Konzentration von 400 ng/ml für 30 Min behandelt, um die Bindung des VWF nach Hemmung des Mac-1-Rezeptors zu bewerten. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und einer Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) unterzogen. Hierfür wurden die behandelten oder ruhenden Zellen nach dem Waschen in ibidi µ-Slide 4-Kammern (mit Glasboden, beschichtet mit Poly-L-Lysin; ibidi, Deutschland) bei einer Konzentration von 500.000 bis 700.000 Zellen pro Kammer überführt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen und danach für 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert, um die Zellen am Glasboden der Kammern festzusetzen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 % Formalin für 10 Min fixiert und mit einer PBS-Azid-Lösung mit 0,1% Triton X-100 für 15 Min permeabilisiert. Nach der Permeabilisation wurden die Zellen mit einem Blockierungspuffer, der 2% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) und 0,1% Triton X-100 in PBS-Lösung enthält, bei Raumtemperatur für 60 Min inkubiert. Nach der Permeabilisation und Blockierung wurden den Zellen die primären Antikörper gegen VWF (polyklonaler Kaninchen-Anti-VWF; DAKO, Dänemark) und gegen CD11b, einen Bestandteil des Mac-1-Rezeptors (Maus-Anti-CD11b; Santa Cruz Biotechnology, USA) zugegeben. Die primären Antikörper wurden über Nacht bei -4 ºC zur Inkubation belassen. Nach dem Entfernen der Lösung mit den primären Antikörpern wurden die Zellen gewaschen und die sekundären fluoreszierenden Antikörper Anti-Kaninchen Alexa Fluor-488 und Anti-Maus Alexa Fluor-555 (beide von Invitrogen, USA) hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine negative Kontrollprobe vorbereitet, indem die primären Antikörper weggelassen wurden. Nach lichtgeschützter Inkubation der Zellen und der negativen Probe mit den fluoreszierenden sekundären Antikörpern für 60 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben gewaschen. Die hiermit gefärbten Zellen wurden mit dem Apotome.2-Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) dargestellt, und es wurden dreidimensionale Bilder mit Hilfe von Z-Bilderserien erstellt. Die Messung der Intensität des VWF-Signals erfolgte durch die Berechnung der mittleren VWF-Intensitätswerte (mean intensity value, MIV) mit der Software ZEN 2.6 (blue edition; Carl Zeiss, Deutschland). Es wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungen durchgeführt.

Bewertung der VWF-Bindung an Neutrophile unter Strömungsbedingungen

Um die Wirkung der Scherflusskraft auf die Bindung von VWF an Neutrophile zu untersuchen, führten wir Experimente unter statischen und Flussbedingungen mit dem Bioflux 200-Instrument (Fluxion Biosciences, USA) durch. Die VWF-Signalintensität zwischen Zellen, die Scherkräften ausgesetzt waren, und ruhenden Zellen wurde mittels IF-Färbung und Mikroskopie analysiert. Die isolierten Zellen wurden zunächst bei 300 g für 5 Min zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen, der autologes Plasma mit VWF enthielt. Anschließend wurden sie in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium 1640 mit Glutamin und 10% FBS resuspendiert. Der Zellsuspension wurde dann entweder das aus Plasma gewonnene VWF/FVIII-Konzentrat (plasma-derived [pd]-VWF/FVIII-Konzentrat Haemate; CSL Behring, Deutschland) oder der rekombinante (r)VWF (VONVENDI; Baxalta, USA) zugesetzt, um eine Konzentration von 100 % (100 IU/dl) zu erreichen. Ein Teil der Zellen wurde bei 37 ºC für 30 Min unter statischen Bedingungen inkubiert. Ein anderer Teil wurde einem Scherfluss von 10 dyne/cm² für 30 Min bei 37 ºC ausgesetzt. Um die Bindung des zugesetzten pdVWF an Neutrophile zu bestätigen und eine mögliche, durch Scherkräfte induzierte VWF-Produktion in Neutrophilen auszuschließen, wiederholten wir die Experimente, indem wir die Zellen entweder mit oder ohne Zusatz von pdVWF einem Scherfluss aussetzten. Die isolierten Zellen wurden in RPMI-Medium (mit Glutamin und 10 % FBS) resuspendiert und bei 10 dyne/cm² für 30 Minuten bei 37 ºC einem Scherfluss ausgesetzt, entweder ohne oder nach Zugabe des pdVWF/FVIII-Konzentrats in einer Konzentration von 100 IU/dl. Anschließend wurden die Zellen gesammelt, in ibidi µ-Slide 4-Kammern überführt, fixiert und nach dem IF-Färbungsprotokoll behandelt. Als primäre Antikörper wurden ein polyklonaler Kaninchen-Anti-VWF sowie der Maus-Anti-CD11b verwendet, und als sekundäre Antikörper kamen Anti-Kaninchen Alexa Fluor-488 und Anti-Maus Alexa Fluor-555 zum Einsatz. Wie oben beschrieben, wurde die Intensität des VWF-Signals durch die Berechnung der MIV des VWF mit der Software ZEN 2.6 nach Mikroskopie-Bildgebung mit dem Apotome.2-Mikroskop ausgewertet.

Untersuchung der VWF-Internalisierung durch Analyse des intrazellulären Transports

Um zu bestimmen, ob VWF von Neutrophilen internalisiert wird, untersuchten wir den Transportweg von VWF, indem wir die Kolokalisation von VWF mit endosomalen Markern (Frühmarker Early endosome antigen 1 [EEA1] und Spätmarker Ras-related in brain-ähnliche GTPase 7 [Rab7]) zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilten. Die Analyse wurde mithilfe der IF-Färbung und der Mikroskopie durchgeführt. In einer ersten Reihe von Experimenten wurden die Neutrophile entweder direkt nach der Isolierung fixiert oder für 60 und 180 Min bei 37 ºC und 5 % CO_2 ohne zusätzliche Behandlung inkubiert und anschließend nach dem IF-Färbungsprotokoll gefärbt. In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir den VWF-Transport nach der Interaktion von Neutrophilen mit VWF unter Scherfluss. Die Zellen wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, für 30 Min den Scherflusskräften bei 10 dyne/cm² nach Zugabe von pdVWF ausgesetzt. Anschließend wurden sie für weitere 30 und 60 Min bei 37 ºC und 5 % CO_2 inkubiert. Für die IF-Färbung wurden primäre Antikörper gegen VWF (Kaninchen-Anti-VWF), EEA1 (Maus-Anti-EEA1; BD Biosciences, USA), Rab7 (Maus-Anti-Rab7; Santa Cruz Biotechnology, USA) und sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen Alexa Fluor-488 und Anti-Maus Alexa Fluor-633. Nach der Gewinnung der 3D-Mikroskopie-Bilder, wie bereits beschrieben, von mindestens n=25 Zellen (bei Internalisierungsexperimenten unter statischen Bedingungen) bzw. n=50 Zellen (bei Internalisierungsexperimenten unter Scherfluss) konnte die Kolokalisationsmessung durch die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten mit der Software ZEN 2.6 erfolgen. Die Experimente wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt, wobei jede Wiederholung dreifach (n=6) durchgeführt wurde.

Messung des VWF-Gehalts im Überstand von Neutrophilen

Um weitere Belege für die Internalisierung von VWF durch Neutrophile zu gewinnen, wurde das VWF-Antigen (VWF:Ag) in den nach der Zentrifugation gewonnenen Überständen von ruhenden und stimulierten Neutrophilen gemessen. Die VWF-Menge wurde mit den Überständen ohne Zellen als negativer Kontrolle verglichen. Nach der Isolierung von Neutrophilen aus dem Vollblut (n=6) wurden die Zellsuspensionen bei 300 g für 5 Min zentrifugiert, und die Überstände mit autologem VWF in neue Röhrchen

überführt. Die verbliebenen Zellsedimente wurden anschließend mit denselben autologen Überständen bei einer Zellkonzentration von 6 x 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit IL-8 (0,7 ng/ml) für 15 Min bei 37 °C stimuliert. Nach der Zentrifugation (350 g für 5 Min) wurden die Zellüberstände gesammelt, und die VWF:Ag-Konzentrationen in den Zellüberständen und den Überständen ohne Neutrophile gemessen. Die Messung des VWF:Ag-Spiegels erfolgte mithilfe eines partikelbasierten turbidimetrischen Assays. Der Assay wurde auf einem BCS XP Gerinnungsanalysator (Siemens Healthcare, Marburg, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Kurz gesagt, wurden Polystyrolpartikel, die mit Antikörpern spezifisch für VWF beschichtet sind, mit der Probe gemischt, was zur Bildung von Immunkomplexen führte. Der dadurch verursachte Anstieg der Trübung wurde photometrisch gemessen. Die Konzentration von VWF:Ag in den Proben wurde durch den Vergleich der Trübung mit einer Standardkurve bestimmt, die mit den im Assay enthaltenen Kalibratoren erstellt wurde.

Western Blotting und Gelelektrophorese von Neutrophilenlysaten

Neutrophile wurden entweder unbehandelt belassen oder mit IL-8 (0,7 ng/ml; für 15 Min bei 37 °C) in Anwesenheit von autologem VWF stimuliert. Die gewaschenen Zellen wurden entweder direkt lysiert (siehe unten) oder zunächst in RPMI-Puffer resuspendiert und für 60 oder 180 Min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, bevor die Zelllyse durchgeführt wurde. Die Zelllyse erfolgte mit Hilfe des M-PER® Reagenzes (Thermo Scientific, USA), ergänzt mit einer Proteaseinhibitor-Tablette (Roche, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Das Western Blotting der Neutrophilenlysate wurde zusammen mit Lysaten von Kontrollzellen durchgeführt, die VWF produzieren. Diese Kontrollzellen umfassen Endothel-Kolonie-formende Zellen (endothelial colony forming cells, ECFCs), die aus gesunden Individuen isoliert wurden, sowie transfizierte humane embryonale Nierenzellen 93T (human embryonic kidney cells, HEK93T-Zellen), die rekombinanten VWF produzieren. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Systeme Mini-Protean® TGX und Mini Trans-Blot® Cell (Biorad, USA). Nach dem Blotting wurde VWF mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen den humanen VWF (Dako, Dänemark), sowie Antikörpern gegen Kaninchen-IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Biorad, USA),

markiert. Um festzustellen, ob der in den Neutrophilenlysaten nachgewiesene VWF extrazellulären Ursprungs war, wurde das gereinigte pdVWF/FVIII-Konzentrat (Haemate-P®, CSL Behring, Deutschland) verwendet. Die Reinigung des Konzentrates erfolgte nach der Methode der Größenausschlusschromatographie auf dem ÄKTA Pure 25-System (Cytiva/GE Healthcare Life Sciences, USA) unter Verwendung einer Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule (Cytiva, Deutschland). Die Proteinreinheit und das Vorhandensein von VWF in den Fraktionen, die dem VWF-Peak entsprachen, wurden durch Coomassie-Färbung und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)-Analyse bestätigt. Das gereinigte pdVWF/FVIII-Konzentrat wurde anschließend mit dem FluoReporter™ FITC-Protein-Labeling-Kit (Invitrogen, USA) fluoreszenzmarkiert. Neutrophile wurden mit IL-8 in Anwesenheit des fluoreszenzmarkierten VWF (bei einer Konzentration von 100 IU/dL) stimuliert, inkubiert und wie oben beschrieben lysiert. Zur Bewertung der Integrität von pdVWF nach Exposition gegenüber stimulierten Neutrophilen wurden die Zelllysate einer Gelelektrophorese auf 4–15 % Mini-Protean® TGX-Gelen (Biorad, USA) bei 180 V für 60 Min unterzogen. Das Fluoreszenzsignal wurde mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad, Deutschland) detektiert.

Untersuchung der Auswirkungen von VWF auf die Expression von Neutrophilen-Oberflächenproteinen und die Bildung extrazellulärer Fallen

Isolierte und gewaschene Neutrophile (Proben von 5 gesunden Individuen) wurden in RPMI-Medium (mit Glutamin und 10 % FBS) resuspendiert und entweder mit IL-8 (0,7 ng/ml; für 15 Min bei 37 °C) oder durch Scherfluss (10 dyne/cm², erzeugt mit dem Bioflux 200) stimuliert. Die Experimente wurden entweder ohne oder mit dem gereinigten pdVWF/FVIII-Konzentrat durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen einer Durchflusszytometrie unterzogen, wie oben beschrieben, um die Oberflächenexpression der Proteine CD16, CD45 und CD66b in jeder Bedingung durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zu bestimmen. Zur Beurteilung der Bildung extrazellulärer Fallen (neutrophil extracellular traps, NETs), wurden isolierte Neutrophile für 120 und 180 Min mit 25 ng/mL PMA stimuliert, entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit des pdVWF/FVIII-Konzentrats. Nach der Stimulation wurden die Zellen fixiert und einer IF-

Färbung unterzogen, wobei CitH3-Antikörper, CD11b und DAPI verwendet wurden, um die NETs-Bildung zu veranschaulichen.

1.3 Ergebnisse

Phänotypcharakterisierung und Vitalitätsbeurteilung der isolierten Neutrophile aus dem Vollblut

Jede Isolierung lieferte lebensfähige Neutrophile, wobei die Vitalität der isolierten Zellen, gemessen auf einem automatisierten Zellzähler unter Verwendung von AO zur Markierung von lebenden Zellen und DAPI zur Markierung toter Zellen, stets zwischen 99 und 100 % lag (Publikationsabbildung 1Ai). Die Reinheit wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt und betrug bei jeder Durchführung jeweils über 95 % (Publikationsabbildung 1B). Hierbei wurden Neutrophile direkt nach der Isolation mit fluoreszierenden Antikörpern gegen spezifische Oberflächenrezeptoren markiert und analysiert, darunter CD16, CD66b und der Leukozytenmarker CD45, zusammen mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollen. Die CD45-positive-Population zeigte einen typischen Neutrophilenanteil (CD66-, und CD16-positiv) von über 95 %. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass über 95 % der isolierten Neutrophilen nach 180 Min Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 noch lebensfähig waren (Publikationsabbildung 1Aii). Darüber hinaus waren über 90 % der Zellen nach 180 Min nicht-apoptotisch, was anhand des Verlustes von CD16, einem Marker für die Apoptose von Neutrophilen, festgestellt wurde (Publikationsabbildung 1C).

Verstärkte Bindung des Plasma-VWF an die Neutrophile nach der Aktivierung

Nach der Stimulation der Neutrophile sowohl mit den Entzündungsfaktoren PMA, TNF-α und IL-8, als auch durch die Scherflusskraft zeigten die IF-Bilder eine erhöhte Bindung von Plasma-VWF an die Zellen (Dissertationsabbildung 2). Dies wurde durch die visuelle Betrachtung und Auswertung der VWF-Signalintensität, gemessen als MIV festgestellt. Neutrophile, die mit TNF-α und PMA in Anwesenheit von autologem Plasma-VWF stimuliert wurden, wiesen signifikant erhöhte durchschnittliche MIV-Werte des VWF-Signals auf. Die MIV-Werte betrugen 494,8 ± 23,9 bzw. 517,3 ± 29,6 im Vergleich zu 313

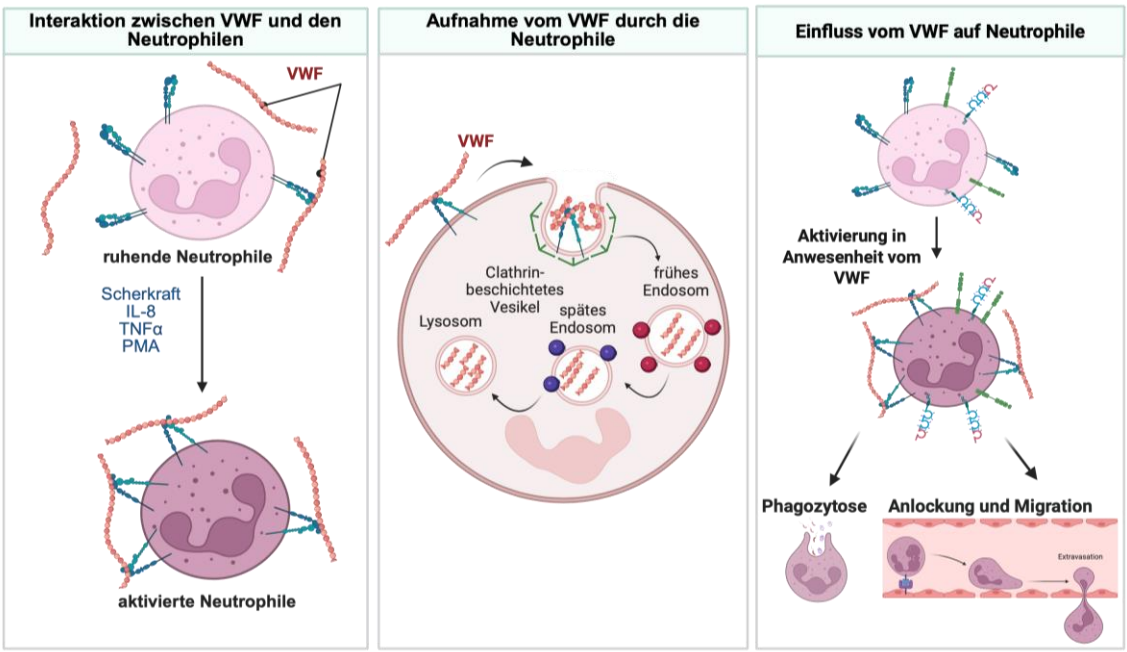
± 10,9 bei nicht-stimulierten Neutrophilen (Publikationsabbildung 2A). Ähnliches zeigte sich bei der Behandlung von Neutrophilen mit IL-8 in Konzentrationen von 0,3, 0,5 und 0,7 ng/ml in Gegenwart von autologem Plasma-VWF: ein deutlicher Anstieg der VWF-MIV-Werte. Diese betrugen 534,4 ± 21,1, 700,4 ± 57,9 und 819,8 ± 58,4 im Vergleich zu 313,5 ± 9,1 bei unbehandelten Zellen (Publikationsabbildung 2B, $p \leq 0{,}0001$). Bemerkenswert war, dass die Kolokalisation von VWF mit CD11b, einem Bestandteil des Mac-1-Rezeptors, nach Stimulation der Neutrophile signifikant verstärkt wurde (Publikationsabbildung 2C). Weitere Analysen, einschließlich der NIF-Behandlung, bestätigten die Bindung von VWF an Neutrophile durch Interaktion mit dem Mac-1-Rezeptor. NIF blockiert das Leukozyten-Mac-1 und verhindert so die Adhäsion seiner Liganden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Neutrophile, die mit PMA in Anwesenheit des NIF stimuliert wurden, keine nachweisbaren VWF-Signale und eine signifikante Reduktion der CD11b-Signale aufwiesen, verglichen mit nicht-stimulierten Neutrophilen (als Kontrolle) sowie mit Neutrophilen, die mit PMA ohne Zugabe von NIF stimuliert wurden (Publikationsabbildung 2D). Darüber hinaus zeigten unsere Experimente einen Anstieg der VWF-MIV-Werte, wenn Neutrophile einem Scherfluss von 10 dyne/cm² nach Zugabe des pdVWF/FVIII-Konzentrats ausgesetzt wurden. Die MIV-Werte betrugen 443,3 ± 19,9 bei den Scherkräften ausgesetzten Zellen gegenüber 297,5 ± 8,4 bei ruhenden Zellen (Publikationsabbildung 3A). Zudem wurde die Kolokalisation vom VWF mit Faktor VIII nachgewiesen (Publikationsabbildung 3D), da sich diese bekanntermaßen gebunden im Kreislauf befinden (Luo et al., 2012; SCHNEPPENHEIM und Budde, 2011). Wenn die Neutrophile den Scherkräften (10 dyne/cm²) in An-, und Abwesenheit vom pdVWF/FVIII-Konzentrat ausgesetzt wurden, ergaben sich VWF-MIV-Werte von 364,0 ± 25,3 bzw. 256,2 ± 7,2 (Publikationsabbildung 3B). Dies bestätigt, dass die erhöhte VWF-Signalintensität auf eine verstärkte Bindung des zugesetzten pdVWF/FVIII zurückzuführen ist und eine mögliche Synthese von VWF durch die Neutrophile unter Strömungsbedingungen ausgeschlossen werden kann. Ähnlich zeigte sich ein Anstieg der VWF-MIV-Werte in Zellen, die in Anwesenheit vom rekombinanten VWF (rVWF) einer Scherkraft ausgesetzt wurden, verglichen mit ruhenden Zellen oder Zellen, die in Abwesenheit von VWF behandelt waren (Publikationsabbildung 3C).

Internalisierung und Abbau des VWF nach der Bindung an Neutrophile

Die Analyse der IF-Bilder von Neutrophilen, die aus dem Vollblut isoliert und ohne zusätzliche Behandlung bis zu 180 Min unter statischen Bedingungen inkubiert wurden, zeigte einen Anstieg des Pearson-Koeffizienten der Kolokalisation von VWF und EEA1 von 0,02 ± 0,01 bei Beginn (Zeitpunkt 0) auf 0,13 ± 0,01 nach 60 Min und auf 0,24 ± 0,01 nach 180 Min (Publikationsabbildung 4A, $p \leq 0,0001$). Ebenso verhielt sich der Pearson-Koeffizient von VWF und Rab7 und zeigte einen Anstieg von 0,14 ± 0,01 zu Beginn auf 0,24 ± 0,01 nach 60 Min und auf 0,27 ± 0,01 nach 180 Min (Publikationsabbildung 4B, Dissertationsabbildung 2, $p \leq 0,0001$). Ähnliches Phänomen wurde beobachtet, als Neutrophile zunächst für 30 Min einem Scherfluss in Anwesenheit des pdVWF/FVIII-Konzentrats ausgesetzt und anschließend für 30 und 60 Min inkubiert wurden. Die Analyse des Pearson-Koeffizienten der Kolokalisation von VWF und EEA1 zeigte einen Anstieg von 0,11 ± 0,01 zu Beginn auf 0,20 ± 0,02 nach 30 Min und auf 0,27 ± 0,02 nach 60 Min (Publikationsabbildung 4C, $p \leq 0,0001$). Ebenso stieg der Kolokalisationskoeffizient von VWF und Rab7 von 0,13 ± 0,01 zu Beginn auf 0,15 ± 0,02 nach 30 Min und auf 0,29 ± 0,02 nach 60 Min (Publikationsabbildung 4D). Um die Internalisierung des VWF durch Neutrophile zu quantifizieren, verglichen wir die VWF:Ag-Konzentration in den nach der Zentrifugation gewonnenen Überstanden von mit IL-8, TNF-α und PMA stimulierten Neutrophilen mit den Überstanden von ruhenden Zellen und der negativen Kontrolle (Überstand gewonnen aus einer zellfreien Suspension). Es zeigte sich eine Reduktion der VWF:Ag-Konzentration um durchschnittlich 2,6 %, 2 % bzw. 2,4 % (p-Wert ≤ 0,001) im Vergleich zu den Überstanden von ruhenden Zellen und der negativen Kontrolle (Publikationsabbildung 5A). Zur Veranschaulichung des Abbaus von VWF nach Aufnahme in die Neutrophile führten wir Western-Blot-Analysen von Lysaten ruhender und mit IL-8 stimulierter Neutrophile, nach 0, 60 und 180 Min Inkubation durch. Neben dem intakten VWF vollständiger Länge (250 kDa) zeigten sich abgebaute VWF-Fragmente mit Größen von etwa 20 und 70 kDa. Die Intensität der Banden, die den abgebauten Fragmenten vom VWF entsprachen, war in stimulierten Zellen (im Vergleich zum intakten VWF) stärker ausgeprägt als in ruhenden Zellen (Publikationsabbildung 5B). Die Stimulation der Neutrophile mit IL-8 in Anwesenheit von fluoreszenzmarkiertem, gereinigtem pdVWF/FVIII und anschließende Gelelektrophorese zeigte VWF-Fragmente derselben Größe (Publikationsabbildung 5C).

Die Bindung von VWF an Neutrophile beeinflusst deren Funktion

Wir beobachteten eine erhöhte Expression der Proteine CD45 und CD66b auf der Oberfläche von Neutrophilen, die einem Scherfluss ausgesetzt wurden, sowie von Zellen, die mit IL-8 in Anwesenheit von gereinigtem pdVWF/FVIII stimuliert wurden, im Vergleich zu den Zellen ohne Zugabe von VWF in die Suspension (Dissertationsabbildung 2). Die Durchflusszytometrie zeigte eine signifikante Zunahme der MFI der Marker CD66b und CD45 bei Neutrophilen, die einer Scherkraft in Anwesenheit von VWF ausgesetzt waren. Die MFI von CD66b war um 35,3 ± 5,66 % erhöht und die von CD45 um 29,7 ± 7,37 % jeweils im Vergleich zu den MFI-Werten gemessen an den Zellen, die ohne Zugabe von VWF untersucht waren (Publikationsabbildung 6A, p-Wert ≤ 0,001 bzw. ≤ 0,01). Ebenso



Dissertationsabb. 2. Graphische Zusammenfassung. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Der linke Kasten zeigt die Wechselwirkung zwischen den Neutrophilen und dem frei im Plasma zirkulierenden VWF. Neutrophile sind in der Lage, den zirkulierenden VWF zu binden, wobei diese Bindung vielfach nach Aktivierung der Neutrophile durch stimulierende Zytokine oder Scherkräfte verstärkt wird. Der Kasten in der Mitte veranschaulicht die Fähigkeit der Neutrophile, den VWF nach der Bindung aufzunehmen. Wir betrachteten einen der vielen möglichen Wege der Internalisierung, der Clathrin, Endosomen und Lysosomen involviert. Im rechten Kasten wird der Einfluss der VWF und Neturophilen-Wechselwirkung auf deren Funktion dargestellt: es kommt zur Modulation der Phagozytose, der Anlockung der Neutrophile an das entzündete Endothel und deren Extravasation.

wurde eine Zunahme der MFI um 27,9 ± 10,12 % für den Marker CD66b und um 15,2 ± 3,69 % für CD45 auf IL-8-stimulierten Zellen in Anwesenheit von gereinigtem pdVWF/FVIII beobachtet, verglichen mit stimulierten Zellen ohne VWF (Publikationsabbildung 6B, p-Wert ≤ 0,05 bzw. ≤ 0,01).

Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass VWF die Bildung von NETs (Neutrophil Extracellular Traps) fördert, nachdem isolierte Neutrophile mit PMA stimuliert wurden, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von VWF, über Inkubationszeiten von 60, 120, 180 und 240 Min. Die signifikantesten Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne VWF-Zugabe wurden nach 120 und 180 Min beobachtet. Nach 120 Min zeigte eine größere Anzahl an Zellen mit VWF-Zugabe desintegrierte Zellkerne im Vergleich zu den Zellen ohne Zugabe von VWF. Außerdem traten nach 180 Min mehr Zellen mit VWF in die NETose-Phase ein (etwa 50 % der Zellen mit wolkigem Aussehen und 50 % in schießender Form) als Zellen ohne VWF (Publikationsabbildung 7).

1.4 Diskussion

VWF ist ein großes, multimeres Blutplasmaprotein, das bekanntermaßen eine der wichtigsten Rollen bei der Blutgerinnung spielt (Lyons und Ginsburg, 1994; Reininger, 2008; Ruggeri und Mendolicchio, 2015). Neuere Studien lieferten zusätzlich Hinweise auf die vielfältige Beteiligung des VWF an vaskulären Entzündungen (Gragnano et al., 2017; Luo et al., 2012). Zwar wurden mehrere Zusammenhänge vorgeschlagen und beschrieben, doch scheinen die zugrunde liegenden Mechanismen komplexer zu sein und bedürfen weiterer Untersuchungen (Aymé et al., 2017; Denis et al., 2001; Drakeford et al., 2022). Ein indirekter Hinweis darauf ist die Tatsache, dass VWF die Bildung von WPK fördert, die bekanntermaßen nicht nur als Speicherorganellen für VWF, sondern auch zahlreiche proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle fungieren (Koupenova et al., 2018; Nightingale et al., 2018; Starke et al., 2011; WEIBEL und PALADE, 1964; Yadegari et al., 2022a). Es wurde außerdem vorgeschlagen, dass der an das Endothel verankerte VWF während einer Entzündungsreaktion in der Lage ist, Leukozyten an die Verletzungsstelle anzulocken und deren Migration zu unterstützen, und zwar durch die Bindung an die Leukozytenrezeptoren Mac-1 und P-Selectin (Pendu et al., 2006; Petri et al., 2010). In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Wechselwirkung

zwischen ungebundenem (frei im Blutplasma zirkulierendem) VWF und Neutrophilen. Wir konnten zeigen, dass auch frei zirkulierender VWF über den Mac-1-Rezeptor an Neutrophile bindet, was die Ergebnisse einer früheren Studie von Pendu et al. ergänzt, in der die Bindung von endothelgebundenem VWF an Integrinrezeptoren auf polymorphkernigen Neutrophilen beschrieben wurde. Der Mac-1-(CD11b/CD18)-Rezeptor gehört zu den β2-Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Er spielt eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort, indem er Interaktionen mit dem Endothel, Degranulation und Zytokinproduktion vermittelt (Hyun et al., 2019; Szeifert et al., 2021). Die Bindung des zirkulierenden VWF an Neutrophile war gesteigert, wenn diese unter einem Scherfluss von 10 dyn/cm² untersucht wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass plasmatischer VWF selbst unter physiologischen Bedingungen an Neutrophile binden kann, möglicherweise durch eine scherflussinduzierte Aktivierung von β2-Integrinen. Zudem beobachteten wir eine gesteigerte Bindung von VWF nach Behandlung der Neutrophile mit den Zytokinen IL-8 und TNFα, die bekanntermaßen bei vaskulären Entzündungsprozessen vermehrt vorhanden sind (Bradley, 2008; Mao et al., 2018). Wir konnten zeigen, dass Neutrophile in der Lage sind, den frei zirkulierenden VWF aufzunehmen, indem wir eine zeitabhängig zunehmende Kolokalisation von VWF mit den endosomalen Markern EEA1 und Rab7 beobachteten. Dieser Prozess wurde durch Flussbedingungen verstärkt. Es ist bekannt, dass Neutrophile verschiedene Endozytosemechanismen zur Internalisierung von Proteinen nutzen (Joshi et al., 2012; Kerr und Teasdale, 2009; Swanson, 2008), unter anderem die clathrinvermittelte Endozytose, bei der ein Protein nach der Bindung an die Zelloberfläche in clathrin-beschichtete Vesikel aufgenommen wird, die zunächst mit frühen Endosomen (EEA1-markiert), dann mit späten Endosomen (Rab7-markiert) sowie Lysosomen fusionieren, um dort abgebaut zu werden (Conner und Schmid, 2003; Uriarte et al., 2009). Diese Fähigkeit der Neutrophile zur VWF-Aufnahme bestätigten wir durch Experimente, in denen die VWF-Antigenspiegel im Überstand IL-8-aktivierter Neutrophilen signifikant niedriger waren als bei unbehandelten Zellen. Ergänzend wiesen wir mithilfe von Western-Blot-Analysen nach, dass VWF nach der Bindung an Neutrophile abgebaut wird. Wir entdeckten VWF-Abbauprodukte mit Größen von 20 und 70 kDa in den Zelllysaten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Neutrophile möglicherweise eine Rolle bei der Elimination des zirkulierenden VWF aus dem Blutplasma über einen bislang nicht

beschriebenen Mechanismus spielen. Es ist bekannt, dass Makrophagen wesentlich zur Entfernung von VWF aus dem Kreislauf beitragen (Casari et al., 2013; Shi et al., 2024). Darüber hinaus sind Neutrophile in der Lage, während der Entzündungsprozesse Proteine wie Albumin und Fibrinogen aufzunehmen und zu verarbeiten (Becatti et al., 2016; Mantovani et al., 2011). In der vorliegenden Studie liefern wir erstmals Hinweise darauf, dass Neutrophile möglicherweise ebenfalls zur Clearance von VWF beitragen. Ob Neutrophile zur VWF-Clearance im Ruhezustand beitragen oder hauptsächlich während entzündlicher Prozesse aktiv sind, bleibt zu klären. Weitere Untersuchungen dieses Mechanismus könnten potenziell wichtige Informationen für die Entwicklung therapeutischer VWF-Konzentrate mit verlängerter Halbwertszeit zur Behandlung von VWS-Patienten liefern. Unsere Studie zeigte außerdem, dass sowohl durch Scherkräfte als auch durch IL-8-Stimulation aktivierte Neutrophile eine erhöhte Expression funktioneller Rezeptoren CD45 und CD66b auf der Zelloberfläche aufwiesen, wenn frei zirkulierender, ungebundener VWF in der Zelllösung vorhanden war. Diese Rezeptoren sind an der Aktivierung, Adhäsion, Migration und Effektorfunktion der Zellen beteiligt (Hermiston et al., 2003; Schröder et al., 2006; Zhu et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von VWF an Neutrophile deren Rezeptorexpression, und somit deren Funktion modulieren kann, möglicherweise über die Regulierung von Inside-out-Signalwegen. Zusammenfassend erweitert unsere Studie das Verständnis der Rolle von VWF in entzündlichen Prozessen, indem sie dessen Bindung an Neutrophile, die Aufnahme durch diese Zellen sowie den Einfluss auf die Expression funktioneller Oberflächenrezeptoren aufzeigt.

1.5 Zusammenfassung

Der Von-Willebrand-Faktor (VWF) spielt bekanntermaßen eine zentrale Rolle in der Hämostase. Zudem weist eine zunehmende Zahl an Studien auf seine vielfältige Rolle bei der vaskulären Entzündung hin. In unserer Studie konnten wir wichtige Erkenntnisse über die Rolle des frei im Blutplasma zirkulierenden VWF in Entzündungsprozessen gewinnen, indem wir dessen Interaktion mit neutrophilen Granulozyten beobachteten. Hierfür isolierten wir Neutrophile aus dem Vollblut gesunder Probanden und führten eine Reihe von Experimenten durch, um diese Interaktion ex vivo näher zu untersuchen. Wir konnten

mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen, dass frei zirkulierender VWF an die Zelloberfläche bindet und über die clathrinvermittelte Endozytose als einen der möglichen Wege aufgenommen wird. Diese Bindung wird durch die Aktivierung der Zellen mit Entzündungsmediatoren IL-8, TNFα und durch Scherfluss verstärkt. Die Aufnahme in die Zellen wurde zusätzlich durch den signifikanten Rückgang des VWF-Antigens im Überstand der Zellen nach Aktivierung bestätigt, verglichen mit der Menge des Antigens im Überstand ruhender Zellen. Darüber hinaus konnten wir mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass die Bindung von frei zirkulierendem VWF zu einer verstärkten Expression funktioneller Neutrophilen-Oberflächenproteine CD45 und CD66b führt, was auf eine Zellaktivierung sowie auf den Einfluss des VWF auf Zellfunktionen wie Migration und Phagozytose hinweist. Die Ergebnisse unserer Experimente erläutern neue, spannende Aspekte über die Beteiligung des im Plasma zirkulierenden VWF an Entzündungsreaktionen durch die Bindung an die neutrophilen Granulozyten und die Modulation ihrer Funktionen. Die potenzielle Rolle der Neutrophile bei der Entfernung von VWF aus dem Kreislauf stellt eine bislang nicht beschriebene Art der VWF-Elimination dar und eröffnet ein Feld für die weiterführende Forschung dieses Mechanismus. Ein vertieftes Verständnis der Entfernung und der Interaktion des VWF mit den neutrophilen Granulozyten im Blutplasma kann signifikant zur Entwicklung therapeutischer VWF-Konzentrate für VWS (Von-Willebrand-Syndrom) -Patienten beitragen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Aymé G, Adam F, Legendre P, Bazaa A, Proulle V, Denis CV, Christophe OD, Lenting PJ. A Novel Single-Domain Antibody Against von Willebrand Factor A1 Domain Resolves Leukocyte Recruitment and Vascular Leakage During Inflammation-Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017; 37: 1736–1740

Becatti M, Emmi G, Silvestri E, …, Prisco D. Neutrophil Activation Promotes Fibrinogen Oxidation and Thrombus Formation in Behçet Disease. Circulation. 2016; 133: 302–311

Béguin EP, Przeradzka MA, Janssen EFJ, Meems H, Sedek M, van der Zwaan C, Mertens K, van den Biggelaar M, Meijer AB, Mourik MJ. Endocytosis by macrophages: interplay of

macrophage scavenger receptor-1 and LDL receptor-related protein-1. Haematologica. 2020; 105: e133-e137

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008; 214: 149–160

Casari C, Du V, Wu Y-P, Kauskot A, Groot PG de, Christophe OD, Denis CV, Laat B de, Lenting PJ. Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. Blood. 2013; 122: 2893–2902

Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 2003; 422: 37–44

Denis CV, Andre P, Saffaripour S, Wagner DD. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 4072–4077

Drakeford C, Aguila S, Roche F, …, O'Donnell JS. von Willebrand factor links primary hemostasis to innate immunity. Nat Commun. 2022; 13: 6320

Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, …, Calabrò P. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. Mediators Inflamm. 2017; 2017: 5620314

Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 107–137

Hyun Y-M, Choe YH, Park SA, Kim M. LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. Exp Mol Med. 2019; 51: 1–13

James PD, Goodeve AC. von Willebrand disease. Genet Med. 2011; 13: 365–376

James PD, Lillicrap D. The molecular characterization of von Willebrand disease: good in parts. Br J Haematol. 2013; 161: 166–176

Joshi B, Bastiani M, Strugnell SS, Boscher C, Parton RG, Nabi IR. Phosphocaveolin-1 is a mechanotransducer that induces caveola biogenesis via Egr1 transcriptional regulation. J Cell Biol. 2012; 199: 425–435

Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. J Thromb Haemost. 2012; 10: 1646–1652

Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. J Thromb Haemost. 2017; 15: 1285–1294

Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. Traffic. 2009; 10: 364–371

Keuren JFW, Baruch D, Legendre P, Denis CV, Lenting PJ, Girma J-P, Lindhout T. von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. Blood. 2004; 103: 1741–1746

Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. Circ Res. 2018; 122: 337–351

Leebeek FWG, Eikenboom JCJ. Von Willebrand's Disease. N Engl J Med. 2016; 375: 2067–2080

Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. Blood. 2015; 125: 2019–2028

Löf A, Müller JP, Brehm MA. A biophysical view on von Willebrand factor activation. J Cell Physiol. 2018; 233: 799–810

Luo G-P, Ni B, Yang X, Wu Y-Z. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. Acta Haematol. 2012; 128: 158–169

Lyons SE, Ginsburg D. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. Trends Cardiovasc Med. 1994; 4: 34–39

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2011; 11: 519–531

Mao Y-M, Zhao C-N, Liu L-N, Wu Q, Dan Y-L, Wang D-G, Pan H-F. Increased circulating interleukin-8 levels in systemic lupus erythematosus patients: a meta-analysis. Biomark Med. 2018; 12: 1291–1302

McCormack JJ, Lopes da Silva M, Ferraro F, Patella F, Cutler DF. Weibel-Palade bodies at a glance. J Cell Sci. 2017; 130: 3611–3617

Nightingale TD, McCormack JJ, Grimes W, Robinson C, Lopes da Silva M, White IJ, Vaughan A, Cramer LP, Cutler DF. Tuning the endothelial response: differential release of exocytic cargos from Weibel-Palade bodies. J Thromb Haemost. 2018; 16: 1873–1886

O'Sullivan JM, Ward S, Lavin M, O'Donnell JS. von Willebrand factor clearance - biological mechanisms and clinical significance. Br J Haematol. 2018; 183: 185–195

Pendu R, Terraube V, Christophe OD, Gahmberg CG, Groot PG de, Lenting PJ, Denis CV. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. Blood. 2006; 108: 3746–3752

Petri B, Broermann A, Li H, …, Vestweber D. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. Blood. 2010; 116: 4712–4719

Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. Blood Transfus. 2011; 9 Suppl 2: s3-8

Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. Haemophilia. 2008; 14 Suppl 5: 11–26

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Interaction of von Willebrand factor with platelets and the vessel wall. Hamostaseologie. 2015; 35: 211–224

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

Schröder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. Hum Immunol. 2006; 67: 676–682

Shi H, Gao L, Kirby N, …, Xia L. Clearance of VWF by hepatic macrophages is critical for the protective effect of ADAMTS13 in sickle cell anemia mice. Blood. 2024; 143: 1293–1309

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994; 76: 301–314

Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, …, Randi AM. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. Blood. 2011; 117: 1071–1080

Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9: 639–649

Szeifert V, Kolonics F, Bartos B, Khamari D, Vági P, Barna L, Ligeti E, Lőrincz ÁM. Mac-1 Receptor Clustering Initiates Production of Pro-Inflammatory, Antibacterial Extracellular Vesicles From Neutrophils. Front Immunol. 2021; 12: 671995

Tischer A, Brehm MA, Machha VR, …, Auton M. Evidence for the Misfolding of the A1 Domain within Multimeric von Willebrand Factor in Type 2 von Willebrand Disease. J Mol Biol. 2020; 432: 305–323

Uriarte SM, Jog NR, Luerman GC, Bhimani S, Ward RA, McLeish KR. Counterregulation of clathrin-mediated endocytosis by the actin and microtubular cytoskeleton in human neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol. 2009; 296: C857-67

WEIBEL ER, PALADE GE. NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. J Cell Biol. 1964; 23: 101–112

Yadegari H, Biswas A, Ahmed S, Naz A, Oldenburg J. von Willebrand factor propeptide missense variants affect anterograde transport to Golgi resulting in ER retention. Hum Mutat. 2021; 42: 731–744

Yadegari H, Jamil MA, Marquardt N, Oldenburg J. A Homozygous Deep Intronic Variant Causes Von Willebrand Factor Deficiency and Lack of Endothelial-Specific Secretory Organelles, Weibel-Palade Bodies. Int J Mol Sci. 2022a; 23

Yadegari H, Jamil MA, Müller J, Marquardt N, Rawley O, Budde U, El-Maarri O, Lillicrap D, Oldenburg J. Multifaceted pathomolecular mechanism of a VWF large deletion involved in the pathogenesis of severe VWD. Blood Adv. 2022b; 6: 1038–1053

Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. Blood. 2012; 120: 449–458

Zhu JW, Doan K, Park J, Chau AH, Zhang H, Lowell CA, Weiss A. Receptor-like tyrosine phosphatases CD45 and CD148 have distinct functions in chemoattractant-mediated neutrophil migration and response to S. aureus. Immunity. 2011; 35: 757–769

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Kuanyshbek A, Yadegari H, Müller J, Hamedani NS, Ramaraje SU, Oldenburg J. Interplay between circulating von Willebrand factor and neutrophils: implications for inflammation, neutrophil function, and von Willebrand factor clearance. Haematologica. 2025; 110: 1786–1797

https://doi.org/10.3324/haematol.2023.284919

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin durchgeführt.
Betreuung: Prof. Dr. Johannes Oldenburg (Erstbetreuer; Direktor des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin) und PD Dr. Hamideh Yadegari Baharanchi (Zweitbetreuerin; Projektleiterin/Principal Investigator).
Prof. Dr. Johannes Oldenburg unterstützte das Projekt durch wissenschaftliche Beratung und die Bereitstellung finanzieller Mittel. PD Dr. Hamideh Yadegari Baharanchi übernahm die wissenschaftliche Hauptbetreuung. Diese umfasste insbesondere die methodische Einarbeitung, die Versuchsplanung, die Optimierung der Protokolle und die Qualitätskontrolle sowie die Bewertung der Ergebnisse, regelmäßige Ergebnisbesprechungen und die Interpretation der Daten.
Die sämtlichen Versuche, die Zusammenstellung des zur Auswertung verwendeten Datenmaterials, sowie die statistische Auswertung wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Analyse und Bewertung der Durchflusszytometrie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jens Müller. Die Durchführung der VWF-Konzentratreinigung erfolgte mit Unterstützung durch Dr. Shahidi Hamedani und Fr. Ramaraje.
Die Messung des VWF-Antigens erfolgte durch das Gerinnungslabor des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin.
Für die Erstellung der Dissertationsabbildungen 1 und 2 verwendete ich BioRender.com.
Ferner wurde bei der Erstellung dieser Arbeit ChatGPT.com genutzt, um die Grammatik und die Lesbarkeit des Textes zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet.
Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Ich möchte allen danken, die zur Verwirklichung dieser wissenschaftlichen Arbeit und der Dissertation beigetragen haben, insbesondere Prof. Dr. Oldenburg und PD Dr. Yadegari Baharanchi für die konstante fachliche Betreuung auf höchstem Niveau, das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Ich danke auch dem Team der Forschungsabteilung des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, den Mitarbeitern des Gerinnungslabors, und der Blutspende für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag. Für die finanzielle Förderung möchte ich auch dem BONFOR SciMed-Promotionsstipendium danken. Mein Dank geht ebenso an meine Familie und Freunde, die mich über die Jahre geduldig und verständnisvoll unterstützt haben.