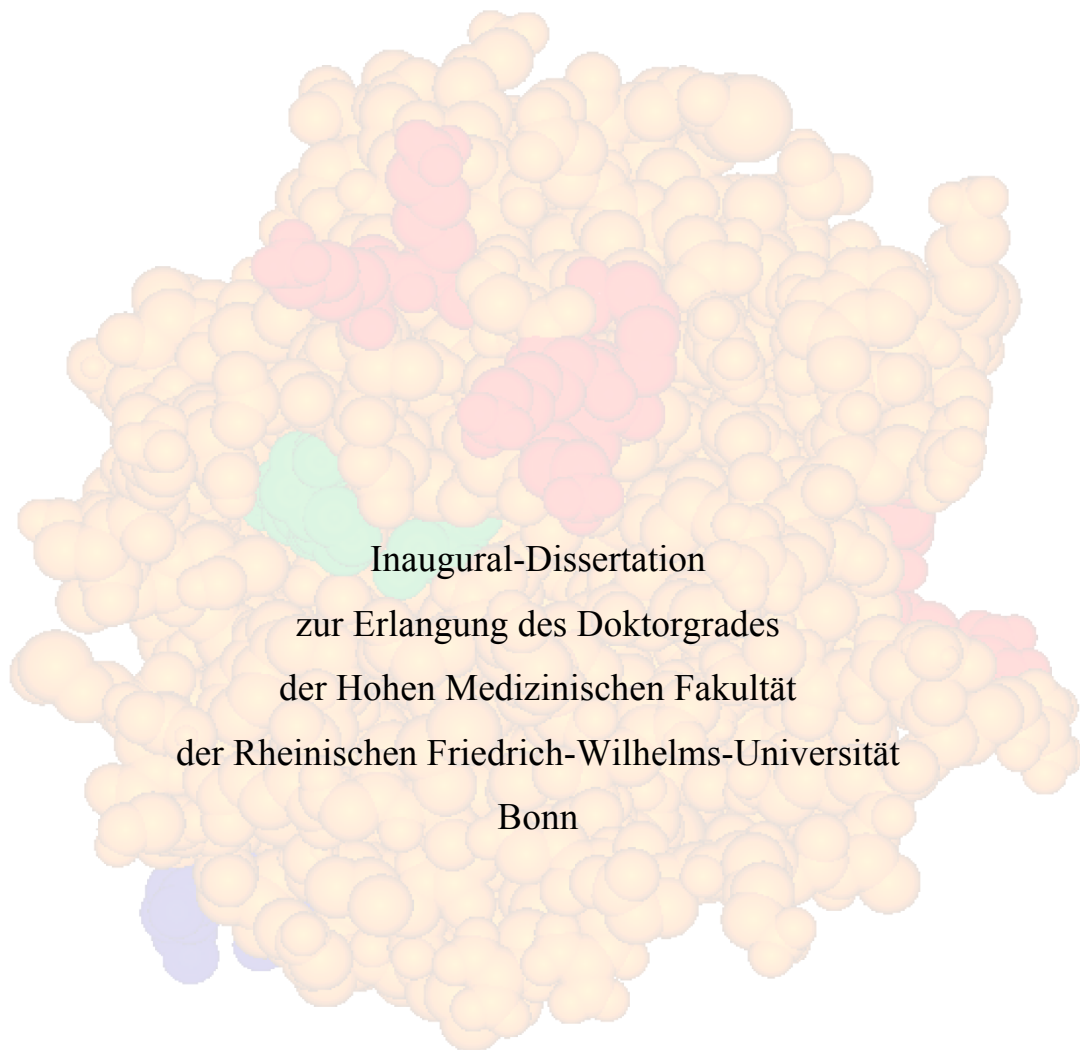


Aufbau und Validierung eines Oligonucleotide Assays
zum Nachweis
von aktiviertem Protein C



Max Julian Friedrich

Berlin

2011

**Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Pötzsch**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Ludwig**

Tag der Mündlichen Prüfung: 29. November 2010

**Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität
Bonn**

Direktor: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Einführung	10
1.2 Grundlagen	14
1.2.1 Die Physiologie der Blutgerinnung	14
1.2.1.1 Einleitung	14
1.2.1.2 Die primäre Hämostase	14
1.2.1.3 Die sekundäre Hämostase	15
1.2.1.4 Die Fibrinolyse	18
1.2.1.5 Hemmende Faktoren des Gerinnungsablaufs	20
1.2.1.6 Plasmatische Gerinnungsstörungen	22
1.2.2 Protein C	25
1.2.2.1 Einleitung	25
1.2.2.2 Die Aktivierung von Protein C	25
1.2.2.3 Die Wirkung von APC	27
1.2.2.4 Die Störung des Systems	29
1.2.3 Aptamere	30
1.2.3.1 Einleitung	30
1.2.3.2 Herstellungsverfahren und Modifizierung	31
1.2.3.3 Aptamere in Diagnostik und Therapie	34
1.2.3.4 Aptamere gegen APC	36
1.3 Zielsetzung und Fragestellung	38
2 Materialien und Methodik	39
2.1 Materialien	39
2.1.1 Verwendete Chemikalien	39
2.1.2 Verwendete Reagenzien	39
2.1.3 Verwendete Pufferlösungen	41
2.1.4 Verwendete Materialien	42

2.1.5	Verwendete Geräte	42
2.2	Methodik	44
2.2.1	Methode und Ablauf des APC-Assays	44
2.2.2	Die Messung der Protein C-Aktivität	47
2.2.3	Die Bestimmung des Protein C-Antigens	47
2.2.4	Die Methode der Ceprotin-Aktivierung und der Vergleich mit Drotrecogin alpha	48
2.2.5	Die Bestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe	48
2.2.6	Die Bestimmung des Prothrombinfragments F1 + F2	49
2.2.7	Die endogene APC-Aktivierung	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Die Wirkung von Aprotinin auf die Messung der APC-Konzentration	52
3.2	Die Wirkung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen	53
3.3	Die Wirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten der Aptamere	54
3.4	Der Vergleich von Drotrecogin alpha mit aktiviertem Ceprotin	55
3.5	Die Messung ohne Aptamerbeschichtung	56
3.6	Der Vergleich unterschiedlicher Peptidsubstrate	57
3.7	Der Vergleich verschiedener Plasmaverdünnungen und Inkubationszeiten	59
3.8	Die Wirkung unterschiedlicher Waschzyklen auf die Messung	60
3.9	Die Halbwertszeit von APC in Vollblut und in Plasma	61
3.10	Der Einfluss von Protein C auf die Messung von APC	65
3.11	Die Berechnung der Reproduzierbarkeit in Citratplasma	67
3.12	Die Leerwert-Problematik	68
3.13	Der Vergleich von Citrat- mit Hirudinplasma	69
3.14	Leerwert in Citratplasma, Hirudinplasma und Citrat- + Hirudinplasma	70
3.15	Der Einfluss von DNAsen	71
3.16	Die endogene APC-Generierung	72
3.17	Ausreißer in Citratplasma und Hirudinplasma	75
3.18	Der Einfluss von Proteaseinhibitoren	76
3.19	Maßnahmen gegen Ausreißer	79

4 Diskussion	82
4.1 Die Rolle des Aprotinins	83
4.2 Die Rolle der Aptamere	84
4.3 Vergleich zwischen rekombinantem und plasmatischem aktivierten Protein C	86
4.4 Die Wahl des Peptidsubstrats	87
4.5 Verschiedene Plasmaverdünnungen und Inkubationszeiten	88
4.6 Die Waschzyklen	89
4.7 Die Halbwertszeit von APC	89
4.8 Der Einfluss von Protein C	90
4.9 Die Reproduzierbarkeit des Testverfahrens	92
4.10 Die Leerwert-Problematik	93
4.11 Der Einfluss von DNAsen	95
4.12 Die Bestimmung von endogen generiertem APC	95
4.13 Problematik und Ursache des überschießenden Substratumsatzes	97
5 Zusammenfassung	99
6 Summary	101
7 Abbildungsverzeichnis	103
8 Literaturverzeichnis	104
9 Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
α_2 -AP	α_2 -Antiplasmin
α_2 -M	α_2 -Makroglobulin
APC	Aktiviertes Protein C
ASS	Azetylsalyzylsäure
AT	Antithrombin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calciumion
CaCl_2	Calciumchlorid
CP	Citratplasma
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDGF	Epidermal growth factor
EDRF	Endothelium-derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor
FI-FXIII	Gerinnungsfaktoren I-XIII
GP	Glykopeptid
HP	Hirudinplasma
Ig	Immunglobulin
LW	Leerwert
M, -M	Molmasse
MgCl_2	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
PAR-1	protease activated receptor 1
PC	Protein C

PCI	Protein C-Inhibitor
PC-MP	Protein C-Mangelplasma
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PP	Poolplasma
RCL	Reactive site loop
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SELEX	Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification
TF	Tissue factor
t-PA	Tissue-Type-Plasminogen-Activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
T-TM-EPCR-Komplex	Thrombin-Thrombomodulin-Endothelialer-Protein C-Rezeptor-Komplex
U	Unit
VP	Verdünnungspuffer
vWF	Von-Willebrand-Faktor
vWS	Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom

1 Einleitung

1.1 Einführung

Der Mechanismus der Hämostase (Blutstillung) ist ein lebenswichtiger Prozess. Durch ihn ist der Organismus in der Lage, Schäden bei Gewebsverletzungen abzudichten und infolgedessen den Austritt von Blut aus den Gefäßen zu reduzieren beziehungsweise zu verhindern. Im Zentrum dieses komplexen Geschehens steht die Blutgerinnung. Sie kommt aber erst durch ein Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Komponenten zustande (*Barthels et al., 2008*). Um einer überschießenden Gerinnung entgegenzuwirken und die Durchlässigkeit der Gefäße weiterhin zu gewährleisten, laufen gleichzeitig auch gerinnungshemmende Prozesse ab. Dieses fein ausbalancierte System ist dafür verantwortlich, dass das Blut in seinem flüssigen Zustand bleibt und koagulatorische Prozesse nur dort stattfinden, wo sie benötigt werden (*Nesheim, 2003*). Wie wichtig die intakte Funktion dieser sensibel justierten Wechselwirkungen zwischen der Gefäßwand, den Thrombozyten, der plasmatischen Komponente und dem fibrinolytischen System sind, zeigt sich bei Erkrankungen und Defekten der Hämostase, die mit erhöhter Blutungsneigung oder aber mit verstärkter Gerinnung einhergehen.

Die Reaktionen der Blutgerinnung sind sorgfältig von antikoagulatorischen Mechanismen kontrolliert, die unter physiologischen Bedingungen zusammen mit den prokoagulatorischen Faktoren ein ausgewogenes System darstellen. Eine wichtige und entscheidende Rolle als Regulator spielt hierbei das Protein C-System. Schlüsselenzym dieses Systems ist das aktivierte Protein C (APC), eine Serinprotease, die an der Endothelzelloberfläche von seinem Zymogen Protein C (PC) generiert wird (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005; Esmon, 2003*). PC gehört zur Familie der γ -Carboxyglutamat-Proteine und wird Vitamin K-abhängig von Hepatozyten synthetisiert. Es zirkuliert im Blut mit einer Konzentration von $\approx 3\mu\text{g/ml}$ (*Griffin et al., 2007*). Die Aktivierung des PC ist ein zweistufiger Prozess und beginnt mit der Bindung von PC an den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR), gefolgt von der proteolytischen Aktivierung durch Thrombin-Thrombomodulin-Komplexe (*Liaw et al., 2001*). APC ist in der Lage, zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die prokoagulatorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren FVa sowie FVIIIa zu inaktivieren. Aufgrund dessen stellt es eine wichtige Komponente in der Kontrolle der Hämostase dar (*Dahlbäck et al., 2005; Esmon, 2004; Liaw, 2004*). Neben seinen antikoagulatorischen Eigenschaften weist APC zusätzlich zytoprotektive, anti-inflammatorische als auch anti-apoptotische

Effekte auf (Esmon, 2004; Griffin et al., 2007). Anhand einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinantem APC die Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis signifikant zu senken vermag. Verantwortlich für diese Tatsache sind vermutlich die bereits erwähnten Eigenschaften des APC (Bernard et al., 2001; Griffin et al., 2002; Levi et al., 2004). Seit sechs Jahren steht APC auch als Medikament zur Verfügung. Xigris® (Drotrecogin alpha) wird rekombinant hergestellt und zur Behandlung der schweren Sepsis eingesetzt (Grinnel et al., 2001; Schellongowski, 2006). Die dabei jedoch auftretenden Nebenwirkungen – beispielsweise unerwünschte Blutungen in etwa 2 % der Fälle – schränken die klinische Verwendung ein (Levi, 2008). Die enorme physiologische Bedeutung des PC offenbart sich bei genetischen oder erworbenen Defekten des Protein C-Systems (Segers et al., 2007). Diese können in einer erhöhten Gefahr für venöse sowie arterielle Thrombosen resultieren.

Trotz seiner klinischen Relevanz existiert bisher kein standardisiertes Testverfahren, welches APC in Plasmaproben schnell und zuverlässig quantifizieren kann. Die exakte Bestimmung der Konzentration des APC im Blut ist hierbei jedoch von entscheidender Bedeutung, um beispielsweise Patienten mit schwerer Sepsis adäquat therapieren zu können. Des Weiteren wäre die Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der APC-Plasmakonzentration von großem Nutzen, um Dauer und Dosis der Therapie mit rekombinanten humanen APC überwachen zu können. Problematisch bei der Bestimmung von APC ist der 1.000 bis 10.000-fache Überschuss von PC, welches nur geringe strukturelle Unterschiede zu APC aufweist und damit eine Unterscheidung zwischen den beiden Proteinen erschwert (Müller et al., 2009). Weitere mögliche Störfaktoren bei der Messung der Serinprotease APC sind Enzymsubstrate sowie Enzyminhibitoren, die physiologisch im Plasma vorliegen und die Sensitivität des Testverfahrens mindern können. Zwar ist es bereits einigen Arbeitsgruppen gelungen, die APC-Konzentration im Plasma zu bestimmen. Allerdings erwiesen sich diese Testverfahren als nicht sensitiv genug und benötigen – je nach Testsystem – Inkubationszeiten von 19 Stunden bis hin zu 3 Wochen, was für die Anwendung im Rahmen der klinischen Routinediagnostik eine zu lange Zeit ist. Liaw et al. gelang es mittels eines nur schwach mit Protein C kreuzreagierenden, monoklonalen Antikörpers die Konzentration des APC zu bestimmen. Da die Sensitivität zu gering war, fand dieses Testverfahren bisher jedoch keinen Eingang in die klinische Diagnostik. Ein weiteres Messverfahren, das auf einem enzym-capture-assay (ECA) basiert, konnte zwar relativ akkurate Messergebnisse liefern, benötigte aber aufgrund der sehr geringen Plasmakonzentrationen von APC zu lange Inkubationszeiten (Gruber and Griffin, 1992).

Da die APC-Aktivität im Blut beziehungsweise Plasma durch dort befindliche Proteaseinhibitoren schrittweise gemindert wird, wurde ein reversibler Inhibitor des APC benötigt, um die irreversible Inhibierung von APC zu verhindern. Zu den Proteaseinhibitoren zählen der Protein C-Inhibitor (PCI), α_1 -Antitrypsin (α_1 AT), α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) sowie α_2 -Makroglobulin (α_2 M) (Huntington, 2003). Beide Arbeitsgruppen verwendeten Benzamidin, einen reversiblen Inhibitor von APC, um die irreversible Inhibierung durch Plasmaproteine zu verhindern. Zur Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität von APC wurde Benzamidin durch mehrere Waschzyklen entfernt. Nachteil im Hinblick der therapeutischen Effizienz von Benzamidin sind die nicht vollständige Selektivität und die unbekannte Toxizität dieser Substanz.

In einem Kooperationsprojekt zwischen dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin und dem Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn wurde ein einzelsträngiges DNA-Aptamer selektiert (siehe Punkt 1.2.3.1), welches mit hoher Spezifität und Affinität an APC bindet. Aufgrund ihrer einzigartigen dreidimensionalen Struktur sind Aptamere zu einer selektiven Interaktion mit einer Vielzahl von Molekülen fähig – seien dies Proteine, Peptide oder aber kleinste Moleküle. Während Antikörper mit ihren hypervariablen Regionen lediglich an definierte Epitope des jeweiligen Zielmoleküls binden können, sind Aptamere in der Lage, zwischen größeren, strukturierten Regionen zu diskriminieren (Mayer *et al.*, 2007). Ihre Bindungseigenschaften, ihre schnelle und einfache Herstellung sowie die Fähigkeit, ihre Zielmoleküle selektiv zu inhibieren, prädestinieren Aptamere als vielversprechende und wertvolle Kandidaten sowohl für die therapeutische Anwendung als auch für die Verwendung in klinischen Testverfahren (Dollins *et al.*, 2008; Famulok *et al.*, 2007). Ein weiterer Vorteil der Aptamere ist, dass sie aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Nukleinsäuren wirksam neutralisiert werden können. Das Antidot besteht aus der Antisense-Struktur des eigentlichen Aptamers und kann durch komplementäre Basenbindung die Funktion und Struktur des Aptamers nachhaltig beeinflussen. Vor allem bei so sensibel ausgeglichenen Prozessen wie der Blutgerinnung ist es von enormem Vorteil, wenn bei einem Therapeutikum die Möglichkeit besteht, ein Antidot zu verabreichen und somit die Gefahr eines Ungleichgewichtes zu vermeiden beziehungsweise zu behandeln. Automatisierte Herstellungsmethoden erlauben es, RNA- und DNA-Sequenzen zu entwickeln, die mit nanomolarer Affinität und hoher Spezifität an eine Vielzahl von extra- aber auch intrazelluläre Moleküle binden. Aptamere weisen nicht nur herausragende Bindungseigenschaften auf, sondern könne auch Funktionen ihrer Zielmoleküle modulieren beziehungsweise inhibieren. Für die Durchführung eines Testverfahrens zur Bestimmung der APC-Konzentration

wird ein Ligand benötigt, der signifikant zwischen APC und seinem Zymogen diskriminieren kann, da die Plasmakonzentration von PC etwa 1000 mal höher ist als die von APC. Mit der Entwicklung des DNA-Aptamers HS02, der mit einer Affinität von $K_D \approx 0,5$ nM spezifisch an APC bindet, steht ein vielversprechender Kandidat zur Entwicklung eines solchen Testverfahrens zur Verfügung. Durch Blockade der Exosite des APC wirken die Aptamere aber auch als selektive und potente Inhibitoren der antikoagulatorischen Funktion des APC. Gleichzeitig verstärkt die Bindung des Aptamers an APC die Inaktivierungsrate der Protease durch den Protein C-Inhibitor. Die anti-apoptischen Eigenschaften des APC werden von den Aptameren jedoch nicht beeinflusst, was darauf hindeutet, dass die zytoprotektiven Fähigkeiten des APC erhalten bleiben (*Müller et al., 2009*).

Neben der Zielsetzung des Aufbaus eines sensitiven und selektiven Testsystems zur Quantifizierung der APC-Plasmakonzentration dient dieses Projekt auch der möglichen Entwicklung eines Medikaments, das die APC-Aktivität in-vivo inhibieren und deshalb im Rahmen einer APC induzierten Blutung angewendet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit soll mit den APC-Aptameren ein Testverfahren zum Nachweis von APC aufgebaut und validiert werden. Die Basis der Arbeit bildet die Hypothese, dass selektierte APC-Aptamere zum Aufbau eines Nachweisverfahrens geeignet sind und die Sensitivität und Spezifität eines derartigen Testverfahrens einem herkömmlichen ELISA-Verfahren oder anderen Methoden zum Nachweis von APC überlegen sind.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Die Physiologie der Blutgerinnung

1.2.1.1 Einleitung

Nach Verletzungen von Gefäßen und des sie umgebenden Gewebes kommt es zu komplexen Reparaturvorgängen. Der Organismus schützt sich mit dem Mechanismus der Blutstillung (Hämostase) vor Blutverlust (*Opal, 2003*). Die Gerinnung kommt durch das Zusammenwirken von vaskulären, zellulären sowie plasmatischen Komponenten zustande (*Barthels et al., 2008*). Im Gleichgewicht mit der Blutstillung steht das fibrinolytische System, das dafür verantwortlich ist, dass es nach der Bildung eines Gerinnsels auch wieder zu dessen Auflösung und damit einhergehend zu einer Rekanalisierung von Gefäßen kommt. Unter physiologischen Bedingungen stehen Blutgerinnung und Fibrinolyse miteinander im Gleichgewicht. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu einer gesteigerter Thromboseneigung oder aber zu einer erhöhten Blutungsneigung kommen (*Rau et al., 2007*).

Der Gerinnungsvorgang läßt sich in die primäre und die sekundäre Hämostase untergliedern, wobei diese Unterteilung vor allem didaktischen Charakter hat. Unter physiologischen Bedingungen laufen beide koagulatorischen Vorgänge parallel zueinander ab. Eine strikte Trennung zwischen diesen Reaktionen kann nicht vorgenommen werden, da es zu komplexen Wechselwirkungen kommt. Nur durch das Zusammenwirken von zellulären, plasmatischen und vaskulären Komponenten kann letztendlich das gemeinsame Ziel der effektiven Blutstillung erreicht werden (*Gerlach et al., 1993*).

1.2.1.2 Die primäre Hämostase

Die vaskulären und zellulären Vorgänge der Blutstillung bezeichnet man auch als primäre Hämostase. Wenn es zu einer Gefäßverletzung kommt, wird sie innerhalb von Sekunden aktiviert und verhindert so zwar in Kürze, aber nur vorübergehend einen erhöhten Blutverlust (*Verstraeten et al., 1993*). Die Reizung von glatten Muskelzellen zieht eine reflektorische Kontraktion der Blutgefäße nach sich. Diese Kontraktion wird unterstützt durch die Freisetzung von vasokonstriktori-schen Substanzen wie Thromboxan A₂, Katecholamine und Serotonin (*Zucker et al., 1985*). Die hierbei verursachte Verlangsamung des Blutstroms begünstigt die weitere Gerinnung. Die Haupt-

träger der primären Hämostase sind die Thrombozyten. Der erste Schritt, die Plättchenadhäsion, wird infolge des Kontakts mit subendothelialer Matrix ausgelöst, die durch den Endotheldefekt freigelegt wird. Die Wechselwirkungen werden durch adhäsive Glykoproteine vermittelt (*Peters et al., 1999*). Die Anheftung der Thrombozyten an Kollagen kommt durch einen spezifischen Kollagenrezeptor, das Glykoprotein GP Ia/IIa, zustande und wird mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors (vWF) gefestigt (*Thomas, 2002*). Der von Endothelzellen und Megakaryozyten sezernierte von-Willebrand-Faktor spielt hierbei eine entscheidende Rolle und dient als Intermediärmolekül zwischen der subendothelialen Matrix und den Thrombozyten (*Varga-Szabo et al., 2008*). Er bindet sowohl an die GP Ib/IX-Rezeptoren der Thrombozyten als auch an subendotheliales Kollagen (*Ruggeri, 1990*). Infolge der Adhäsion gehen die Thrombozyten in einen aktivierten Zustand über und sezernieren verschiedene Mediatoren. Die wichtigsten sind ADP, Fibrinogen, vWF, Thromboxan A_2 , Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF), Serotonin und Katecholamine (*Bergmeier et al., 2008*). Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu deren Gestaltänderung; es kommt zur Ausbildung von Pseudopodien (shape change) und damit zu erhöhter Adhäsivität (*Andrews et al., 1998*). Des Weiteren kommt es durch die Aktivierung der Thrombozyten zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa, was zur Folge hat, dass dieses nun auch lösliche Liganden binden kann. So steigt beispielsweise die Affinität zu Fibrinogen um mehrere Zehnerpotenzen (*Steinhubel et al., 2005*). Aufgrund der Bindung von Fibrinogen an das GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche kommt es zur Bildung großer Thrombozytenaggregate. Eine irreversible Aggregation wird erreicht durch Membranverschmelzung, unterstützt von Thromboxan A_2 (*Baruch, 2006*). Vasokonstriktion und Pfropfbildung aus aggregierten Plättchen führen schließlich etwa ein bis drei Minuten nach der Verletzung zur vorläufigen Blutstillung (*Pötzsch et al., 2006*).

1.2.1.3 Die sekundäre Hämostase

Nahezu gleichzeitig mit der primären Hämostase setzt auch die sekundäre Hämostase ein. Hierunter versteht man die plasmatischen Vorgänge der Blutgerinnung, die zum endgültigen Verschluss einer Gefäßverletzung führen.

Das plasmatische Gerinnungssystem besteht aus zahlreichen Gerinnungsfaktoren, meist Serinproteasen, die sich durch enzymatische Spaltung gegenseitig aktivieren oder Kofaktoren bei diesen Reaktionen darstellen. Für die mechanische Festigkeit des Thrombus sorgt letztendlich ein

Netzwerk aus Fibrin, welches in seiner polymeren Faserform unlöslich ist (*Weisel, 2007*). Neben den Gerinnungsfaktoren spielen auch Ca^{2+} -Ionen und Phospholipide eine entscheidende Rolle. Die Phospholipide stammen aus der Thrombozytenmembran, in deren Doppelschicht sie inhomogen verteilt sind. Durch Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Veränderung der Phospholipidzusammensetzung. Saure Phospholipide, insbesondere Phosphatidylserin, gelangen auf die äußere Membranschicht. Man spricht hierbei von einem Flip-Flop-Mechanismus (*Sims et al., 1989*). Aufgrund der veränderten Zusammensetzung der inneren und äußeren Plasmamembran entstehen nun auf der Oberfläche der Thrombozyten Bindungsstellen für Gerinnungsproteine (*George und Shattil, 1991*). Diese Phospholipide dienen im Komplex als Matrix, an die die Gerinnungsfaktoren mit Hilfe von Ca^{2+} -Ionen binden können (*Ruf et al., 1991; Thomas, 2002*).

Ein Großteil der Faktoren hat Enzymcharakter. Sie liegen normalerweise im Plasma in inaktiver Form vor, werden jedoch nach Auslösung der Gerinnung stufenweise aktiviert. Kaskadenartig laufen nun die einzelnen Reaktionen ab, was bedeutet, dass die Aktivierung jeweils mittels des aktiven Faktors der vorangegangenen Aktivierungsreaktion durch sogenannte limitierte Proteolyse erfolgt (*Stassen et al., 2004*). Der inaktive Faktor wird proteolytisch gespalten, sodass sich aus einer Polypeptidkette zwei Ketten bilden, die mit Disulfidbrücken verbunden sind. Aufgrund dieser Reaktion kommt es zu einer Freisetzung des aktiven Zentrums des Enzyms und damit zur Auslösung der katalytischen Aktivität (*Chen et al., 2006*). Die Aktivierungsschritte der Gerinnungsfaktoren laufen über zwei verschiedene Kaskaden ab, die man als exogenen und endogenen Weg des Gerinnungssystems bezeichnet (*Norris et al., 2003*). Diese beiden Kaskaden, zwischen denen Querverbindungen bestehen, unterscheiden sich in der Reaktionsabfolge bis zur Bildung des Prothrombin-Aktivators, über den sie gemeinsam in die zentrale Reaktion der Prothrombinaktivierung münden (*Crawley et al., 2008*).

a) Der exogene Weg:

Im Organismus ist der tissue factor (TF, Gewebsthromboplastin) entscheidend für die Auslösung der Thrombinbildung (*Price et al., 2004*). Der TF ist der einzige Gerinnungsfaktor, der ein integrales Membranprotein ist und nur in sehr niedriger Konzentration im Blut zirkuliert. Er wird bei Gewebsverletzungen aus zerstörten Zellen freigesetzt (*McVey et al., 1999*). TF bildet mit Faktor VIIa, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden einen membrangebundenen Komplex. Dieser Komplex (exogene Tenase) kann nun einerseits seine eigene Bildung fördern (positive Rückkopplung) und andererseits Faktor X sowie Faktor IX aktivieren (*Mackman et al., 2007*). Faktor IX bildet mit

Phospholipiden und Ca^{2+} -Ionen sowie Faktor VIIIa einen Komplex, an dem die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa erfolgt (*Rojkjaer und Rojkjaer, 2007*).

b) Der intrinsische Weg:

Der intrinsische Aktivierungsweg beginnt mit der Kontaktaktivierungsphase. Faktor XII wird durch den Kontakt mit fremden Oberflächen im Komplex mit hochmolekularem Kininogen (HMWK, high molecular kininogen), Präkallikrein (PK) und Kallikrein (K) aktiviert (*Liu und He, 2000*). Der aktivierte Faktor XII katalysiert nun zum einen die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein und spaltet zum anderen proteolytisch den Faktor XI, was wiederum die Spaltung des Faktors IX zur Folge hat. Dieser bildet, wie bereits erwähnt, zusammen mit Phospholipiden, Ca^{2+} -Ionen und Faktor VIIIa einen Komplex (endogene Tenase), der den Faktor X zu Faktor Xa aktiviert (*Johne et al., 2006*). Aufgrund der Tatsache, dass ein Mangel an Präkallikrein, HWMK oder Faktor XII zu keiner erhöhten Blutungsneigung führt, geht man davon aus, dass dieser Reaktionsweg ein phylogenetisches Erbe darstellt und für die Blutgerinnung bedeutungslos ist (*Schmaier and McCrae, 2007*).

c) Der gemeinsame Weg:

Infolge der Aktivierung des Faktors X gehen nun beide Wege in einen gemeinsamen über. Faktor Xa bildet einen Komplex aus Phospholipiden und Ca^{2+} -Ionen. Durch Anlagerung von Faktor Va wird dessen Aktivität wesentlich verstärkt. Dieser Komplex wird auch als Prothrombinase-Komplex oder Prothrombin-Aktivator bezeichnet (*Autin et al., 2006*). Thromboplastin spaltet Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa). Thrombin aktiviert wiederum die Faktoren XI, VII und V im Sinne einer positiven Rückkopplung (*Davie et al., 2006*). Die Serinprotease Thrombin ist das zentrale Gerinnungsenzym. Es spaltet von der $\text{A}\alpha$ - und $\text{B}\beta$ -Kette von dem langkettigen Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab (*Mosesson, 2005*). Diese nun faserigen, dreidimensionalen Fibrinstrukturen werden von dem ebenfalls durch Thrombin aktivierten Faktor XIII mit Hilfe der Ausbildung kovalenter Bindungen verfestigt (*Kehrel, 2003*). Das Zusammenspiel von primärer und sekundärer Hämostase führt somit zu einem stabilen Thrombus aus polymerisiertem Fibrin. In vivo wird sie durch den tissue factor gestartet und bezieht alle Gerinnungsfaktoren mit Ausnahme des Kontaktaktivierungssystems (FXII, HWMK, PK, K) mit ein (*Laurens et al., 2006*).

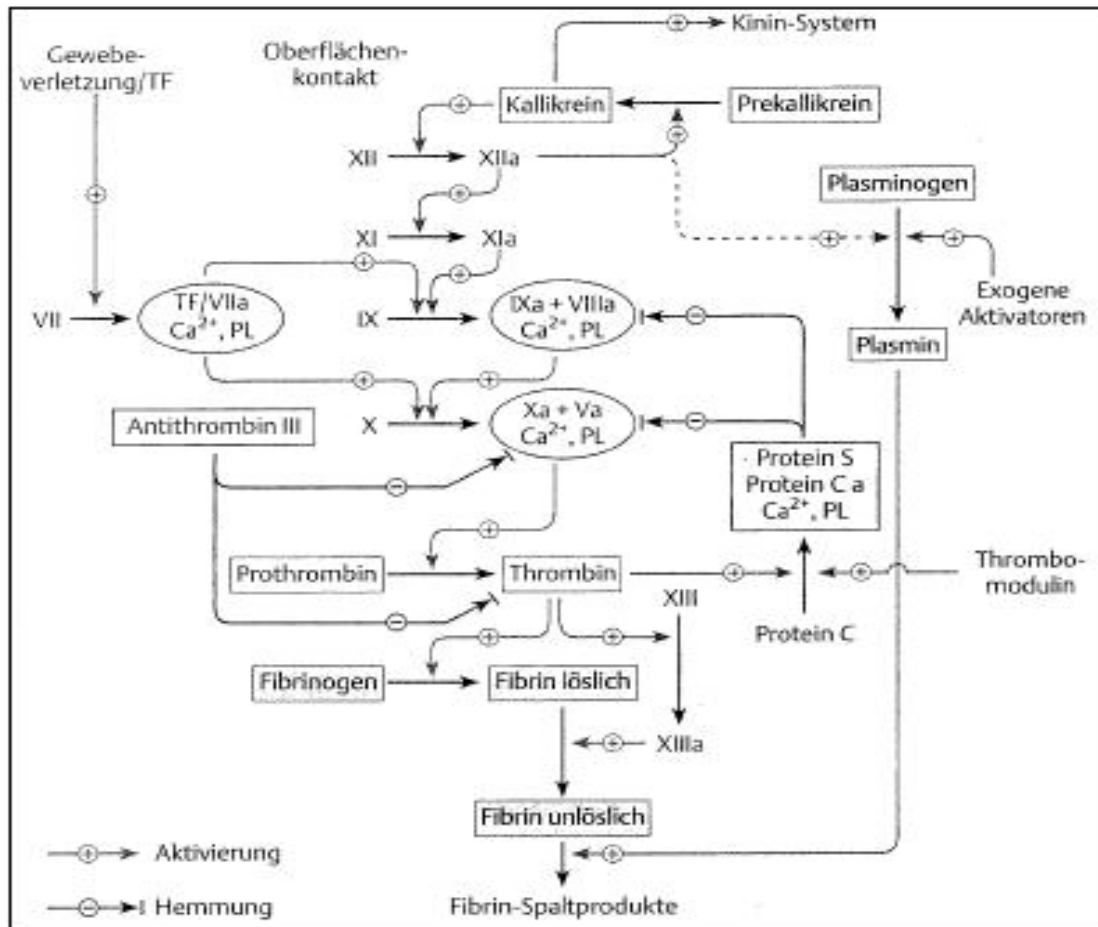


Abb. 1: Darstellung des plasmatischen Gerinnungssystems;
 APC = aktiviertes Protein C, TF = Tissue Factor, PL = Phospholipide
 Ca²⁺ = Calcium, Gerinnungsfaktoren römisch nummeriert
 Modifiziert aus: Dörner K., *Klinische Chemie und Hämatologie*, 2006

1.2.1.4 Die Fibrinolyse

Vermutlich laufen unter physiologischen Bedingungen ständig Gerinnungsvorgänge ab, weshalb es stetig zu Fibrinablagerungen kommt. Das fibrinolytische System wird benötigt, um diesen Ablagerungen entgegenzuwirken und um Fibringerinnsel zu entfernen, die bei der Wundheilung entstehen, um so wieder für eine freie Durchgängigkeit des Blutgefäßsystems sorgen zu können (Arnout *et al.*, 2006). Für den Abbau von Fibrin in Fibrin-Spaltprodukte ist die Endopeptidase Plasmin verantwortlich. Das Schlüsselenzym der Fibrinolyse liegt als inaktive Form (Plasminogen) im Plasma vor und wird von Aktivatoren in den aktiven Zustand versetzt (Anglés-Cano,

1994). Zu diesen Aktivatoren gehören insbesondere t-PA (tissue Plasminogen-Aktivator) und die Urokinase, die wiederum von Faktor XIIa und Kallikrein aktiviert wird.

Spezifisch für eine Plasmin-abhängige Spaltung des Fibrins sind die Fibrinabbauprodukte, unter anderem die sogenannten D-Dimere. Sie entstehen durch die Spaltung der Fibrin-Gamma-Kette und spielen in der Labordiagnostik eine wichtige Rolle (Wada und Sakuragawa, 2008). Es gibt jedoch auch körpereigene Hemmstoffe des fibrinolytischen Systems. Die größte Bedeutung kommt dabei dem schnell wirksamen α_2 -Antiplasmin zu. Auch α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin tragen einen entscheidenden Teil dazu bei, das komplexe System im Gleichgewicht zu halten (Reiner und Bell, 1984). Die inhibitorische Wirkung des α_2 -Antiplasmins auf Plasmin beruht auf der kovalenten Bindung an Fibrin mit Hilfe des Faktor XIIIa (Pötzsch und Madlener, 2006).

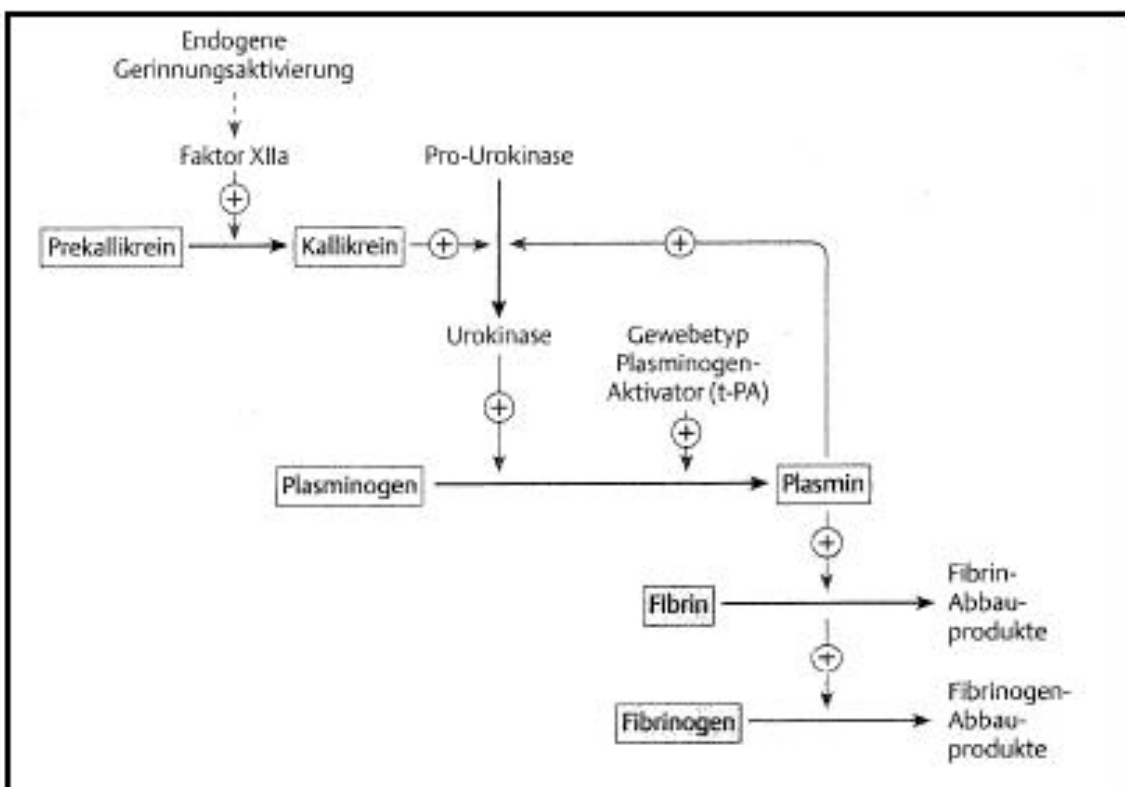


Abb. 2: Aktivierungswege und Mechanismus der Fibrinolyse

Darstellung der einzelnen Gerinnungsfaktoren in römischen Ziffern,

—⊕→ steht für Aktivierung

Modifiziert aus: Dörner K., *Klinische Chemie und Hämatologie*, 2006

1.2.1.5 *Hemmende Faktoren des Gerinnungsablaufs*

Um einer Thrombusbildung im unverletzten Gewebe vorzubeugen, spielen verschiedene Inhibitoren eine wichtige Rolle. Von herausragender Bedeutung ist die Antithrombogenität des Gefäßendothels, deren Wirkung auf der luminalen Sekretion von gerinnungshemmenden Substanzen wie Adenosin, Prostacyclin (PGI₂) und EDRF (Endothelium-derived Relaxing Factor, NO) beruht (*Becker et al., 2000*). Diese verursachen unter anderem einen Konzentrationsanstieg von cAMP sowie cGMP in den Thrombozyten. Ein Anstieg der cAMP- oder cGMP-Konzentration führt zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung, -aggregation und -sekretion (*Walter et al., 1995*). Parallel zum Gerinnungsablauf setzen Mechanismen ein, die eine überschüssige Gerinnungsaktivierung kontrollieren und den weiteren Ablauf der Gerinnungskaskade hemmen. Zu diesen Mechanismen gehören das Protein C, der „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI) und das Antithrombin, ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein. Verbindet sich die Serinprotease mit den Gerinnungsfaktoren, sind diese nicht mehr in der Lage, ihre Funktion zu erfüllen. Bevorzugt entstehen Komplexe zwischen Antithrombin, Thrombin und Faktor Xa (*Quinsey et al., 2004*). Die Komplexbildung läuft unter physiologischen Bedingungen sehr langsam ab, kann aber durch Heparin beschleunigt werden (*Nutescu et al., 2008*). Der TFPI ist ein einzelsträngiges Polypeptid und ein wirksamer Plasmaproteaseinhibitor, der eine wichtige Funktion in der Regulierung der Gerinnungskaskade einnimmt (*Lwaleed und Bass, 2006*). Aus der Inhibierung von Faktor Xa und dem katalytischen Komplex Faktor VIIa/TF ergibt sich eine komplette lokale Inhibierung des Gerinnungsgeschehens (*Golino et al., 2004*). Weitere sehr potente Inhibitoren der Blutgerinnung sind Fibrinolyseprodukte, die beim Abbau von Fibrinogen oder Fibrin durch Plasmin entstehen. Die Wirkung der sogenannten D-Dimere beruht sowohl auf einer Hemmung der proteolytischen Aktivität von Thrombin als auch auf einer Hemmung der Fibrinpolymerisation (*Nesheim et al., 2001*).

Therapeutisch kann die Gerinnung durch verschiedene Stoffe beeinflusst werden. Hervorzuheben sind hierbei Hirudin, Heparin und Vitamin K-Antagonisten (*Girolami et al., 2008*). Hirudin wurde Mitte des letzten Jahrhunderts erstmals aus pharyngealen Drüsen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) gewonnen. Problematisch war jedoch, dass es nur in geringen Mengen zur Verfügung stand. Mit Entwicklung der molekularen Biotechnologie gelang es, rekombinantes Hirudin herzustellen und auch in großen Mengen zu produzieren. Die antikoagulatorische Wirkung des Hirudins beruht auf der Komplexbildung mit Thrombin, das daraufhin inaktiviert wird. Die Bindung zwischen Hirudin und Thrombin ist irreversibel und auch noch außerhalb des physiolo-

gischen pH-Bereichs stabil (*Greinacher und Warkentin, 2008*). Durch die Komplexbildung wird nicht nur die direkte Funktion des Thrombins gehemmt, sondern auch die von Thrombin katalysierten hämostatischen Reaktionen (beispielsweise die Aktivierung der Faktoren V, VIII und XIII) und die Thrombin-induzierte Plättchenaktivierung (*Mureebe, 2007*). Der Vorteil gegenüber anderen Antikoagulantien besteht darin, dass Hirudin weder in die Biosynthese der Gerinnungsfaktoren eingreift noch die Hilfe eines Kofaktors wie zum Beispiel Antithrombin benötigt (*Markwardt, 2002*).

Der klinische Gebrauch von Hirudin ist aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos sowie der nur schwer beherrschbaren Komplikationen beim Auftreten einer Blutung unter der Therapie mit Hirudin eingeschränkt. Weit verbreitet ist hingegen die Verwendung von Hirudin-Analoga, die reversibel an Thrombin binden. Als Beispiel sei hier Bivalirudin genannt, das eine Weiterentwicklung von Hirudin ist und ebenfalls sowohl an die katalytische Seite als auch an die Fibrinogenbindungsstelle (Exosite 1) des Thrombins bindet. Vorteile gegenüber Hirudin sind die Reversibilität der Bindung, die kürzere Plasmahalbwertszeit (25 Minuten vs. 80 Minuten), die nicht-renale Verstoffwechslung und die geringere Immunogenität (*Warkentin, 2004*).

Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin, einer heterogen zusammengesetzten Substanz aus Mukopolysacchariden mit Unterschieden in Kettenlänge und Molekulargewicht, beruht auf einer mehr als 1.000-fachen Funktionsverstärkung des im Blut zirkulierenden Antithrombin III. Es kommt hierbei zu einer Komplexbildung mit Antithrombin, wodurch dessen Hemmwirkung vor allem auf Thrombin und Faktor Xa katalysiert wird (*Harenberg und Fenyvesi, 2004*). Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin besteht hauptsächlich in der beschleunigten Komplexbildung zwischen Antithrombin und Thrombin. Neben der Wirkung auf das Gerinnungssystem hemmt Heparin auch die Plättchenadhäsion und -aggregation. Dies kommt durch die hohe elektrische negative Ladung des Heparins und der sich daraus ergebenden Erhöhung der Ladungsdichte am Gefäßendothel zustande (*Jaques, 1985*). Indikation zur Gabe von Heparin ist in erster Linie die Prophylaxe von Thrombosen, doch auch zur Therapie von Embolien und als Antikoagulans bei der Hämodialyse wird Heparin verabreicht. Bei der Therapie mit Heparin kann es zu Komplikationen wie beispielsweise dem Auftreten einer sogenannten Heparin-induzierten Thrombozytopenie kommen, einem Krankheitsbild, für das meist ein deutlicher Thrombozytenabfall und eine erhöhte Tendenz für venöse Thrombosen und arterielle Embolien charakteristisch ist (*Swanson, 2007*). Um diese Komplikation zu vermeiden beziehungsweise die Antikoagulation nach Auftreten einer HIT fortzuführen, kann auf Argatroban, einen Vertreter der univa-

lenten, direkten Thrombininhibitoren, zurückgegriffen werden. Argatroban ist ein L-Arginin-Derivat, das in der Leber metabolisiert wird und nur an der katalytischen Seite des Thrombins angreift (*Wong und White, 2007*). Ein weiteres Beispiel für therapeutisch eingesetzte Antikoagulantien sind die Vitamin-K-Antagonisten, die sogenannten Cumarine. Ihre Wirkung beruht auf der verminderten Bildung Vitamin-K-abhängig synthetisierter Gerinnungsfaktoren. Hiervon betroffen sind die Faktoren II, VII, IX und X sowie Protein C und S (*Oldenburg et al., 2008*). In der Leber wird normalerweise die Aminosäure Glutamat am γ -C-Atom carboxyliert. Durch diese Carboxylierung wird die negative Ladung der Faktoren erhöht und folglich die Komplexbildung mit positiv geladenen Calciumionen und Phospholipiden optimiert (*Bandyopadhyay, 2008*). Cumarine, die eine Vitamin K-ähnliche Struktur aufweisen, binden kompetitiv an das Enzym Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und blockieren so die γ -Carboxylierung. Deren Hemmung betrifft jedoch nur Gerinnungsfaktoren, die neu synthetisiert werden. Das Wirkungsmaximum der Cumarine wird erst nach 36-48 Stunden erreicht (*Merli und Fink, 2008*).

1.2.1.6 Plasmatische Gerinnungsstörungen

Hämostase und Fibrinolyse stehen normalerweise miteinander im Gleichgewicht, sodass das Blut im Gefäßsystem zirkulieren kann. Kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts, ist entweder eine erhöhte Blutungsneigung (verursacht durch gesteigerte Fibrinolyse oder mangelnde Gerinnung) oder eine erhöhte Gefahr der Thrombusbildung (verursacht durch verminderte Fibrinolyse und gesteigerte Gerinnung) die Folge. Da es zahlreiche Ursachen für Gerinnungsstörungen gibt, werden hier exemplarisch die wichtigsten erwähnt.

Hämophilie A:

Bei der Hämophilie A handelt es sich um einen Mangel oder Defekt von Faktor VIII, der entweder in etwa 50% der Fälle X-chromosomal vererbt wird oder aber als sporadische Erkrankung infolge einer Spontanmutation am X-Chromosom auftritt. Aufgrund des Vererbungsmodus sind hauptsächlich Männer von der Hämophilie A betroffen; die Prävalenz beträgt 1: 10.000 (*Pötzsch und Madlener, 2002*). Wegen des Mangels an Faktor VIII kommt es zu einer verlangsamten Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin und damit zur verminderten Umwandlung zu Fibrinpolymeren (*Terada, 2008*). Die Instabilität des Gerinnsels führt zu mehr oder minder starken Nachblutungen. Typisch sind großflächige Blutungen, Muskelblutungen und Gelenkblutungen

mit Arthropathie, besonders an den Kniegelenken. Je nach Ausmaß der Blutung kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen, die, wenn sie nicht behandelt werden, lebensbedrohlich sein können (*Pipe und Valentino, 2007*). Die bevorzugte Therapie ist die Prophylaxe von Blutungen durch die Substitution von Faktor VIII-Konzentraten (*Franchini et al., 2007*).

Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWS):

Beim vWS handelt es sich mit einer Prävalenz von einem Prozent um die häufigste angeborene Gerinnungsstörung. Die Krankheit wird meist autosomal-dominant vererbt, in seltenen Fällen liegt aber auch ein rezessiver Erbgang vor (*Schneppenheim et al., 2005*). Die Patienten neigen weniger zu spontanen Blutungen als bei der Hämophilie. Zugrunde liegt eine Verminderung oder ein Strukturdefekt des von-Willebrand-Faktors (vWF), wodurch es zu mangelnder Thrombozytenadhäsion am Subendothel, einer verminderten ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und einer verlängerten Blutungszeit kommt (*Frederici und Manucci, 2007*). Aufgrund der Funktion des vWF als Stabilisator des Faktor VIII ist zusätzlich die Fibrinbildung gestört.

Man unterscheidet drei Typen des vWS: Bei Typ 1 ist die Konzentration des vWF vermindert, bei Typ 2, welcher wiederum in vier Subtypen untergliedert wird, ist die Konzentration des vWF meist normal, seine Funktion jedoch gestört und bei Typ 3 fehlt der vWF komplett (*Berntorp, 2006; Fressinaud et al., 2002; Peake und Goodeve, 2007*). Das Krankheitsbild ist variabel und vom Schweregrad des Defekts abhängig, wobei die Mehrzahl der Patienten keine oder nur diskrete Blutungssymptome hat. Bei der schweren Form kann es selbst bei kleinen Gewebdefekten zu schwerwiegenden Blutungen kommen (*Gill, 2007*).

Thrombozytopathien:

Die Ursachen von Funktionsstörungen der Thrombozyten sind zahlreich, wobei sie klinisch durch ähnliche Symptome charakterisiert sind. Während es häufig zu Problemen bei der Blutstillung nach Operationen oder Verletzungen kommt, treten Spontanblutungen meist nicht auf. Man unterscheidet zwischen angeborenen und erworbenen Thrombozytopathien.

- **Erworbene Thrombozytopathien:**

- Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. ASS, Clopidogrel)

- Überzug der Thrombozytenoberfläche mit IgA oder IgG

- Funktionsstörung durch Urämiegifte

- Angeborene Thrombozytopathien:

- Storage-Pool-Erkrankung (Verminderung von Zahl und Inhalt der α - und δ -Thrombozytengranula)
- Bernard-Soulier-Syndrom (Verminderung oder Fehlen des GP Ib/IX-Komplex der Thrombozytenmembran
→ Fehlende Bindungsstelle für von-Willebrand-Faktor)
- Thrombasthenie Glanzmann (Verminderung oder Fehlen des GP IIb/IIIa-Komplex der Thrombozytenmembran
→ Fehlende Bindungsstelle für Fibrinogen)
- Aspirin-like-Defekt (Zyklooxygenasemangel)

Antithrombin-Mangel:

Der hereditäre Antithrombin (AT)-Mangel ist mit einem erhöhten Risiko für prokoagulatorische Komplikationen verbunden (*Quinsey et al., 2004*). Während die homozygote Form des AT-Mangels scheinbar nicht mit dem Leben vereinbar ist, weisen Personen mit heterozygoter Form des AT-Mangels lediglich eine um 50-60 % verminderte Aktivität im Plasma auf. Man unterscheidet zwei verschiedene Typen der Erkrankung. In Fällen, bei denen sowohl die AT-Aktivität als auch die AT-Konzentration im Plasma reduziert ist, spricht man vom Typ I (*Blajchmann, 1994*). Ist hingegen die AT-Plasmakonzentration normal, die Aktivität des AT jedoch vermindert, so spricht man vom Typ II (*Pötzsch und Madlener, 2006*).

Protein C- und Protein S-Mangel:

Der Mangel an Protein C und Protein S führt zu thrombembolischen Komplikationen. Sowohl hereditäre als auch erworbene Defekte (beispielsweise eine verminderten Syntheseleistung der Leber oder Vitamin K-Mangel) sind die Ursache für eine verminderte Plasmakonzentration. Bei der hereditären Form der Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird, unterscheidet man wiederum zwei Typen. Bei verminderter Plasmakonzentration und verminderter Aktivität spricht man vom Typ I, bei reduzierter Aktivität aufgrund eines abnormalen Protein-Moleküls aber normaler Plasmakonzentration spricht man vom Typ II (*Marlar und Mastovich, 1990*).

Ein schwerer Mangel an Protein S und Protein C manifestiert sich meist im Neugeborenenalter in Form der Purpura fulminans. Hierbei kommt es aufgrund von Blutgerinnseln in der Mi-

krozirkulation zu Hämatomen im Gewebe, die als kleine runde Rötungen der Haut imponieren (Marlar und Neumann, 1990).

1.2.2 Protein C

1.2.2.1 Einleitung

Protein C ist eine in der Leber produzierte Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 62.000 Dalton, die Vitamin K-abhängig produziert wird. Im Blut liegt sie als Zymogen vor. Die Aktivierung erfolgt durch Thrombin, das an den endothelialen Thrombinrezeptor Thrombomodulin gebunden hat (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

Protein C kommt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Blutgerinnung zu, da es die Aktivität der Faktoren VIIIa und Va, Kofaktoren in der Aktivierung von Faktor X und Prothrombin, sowie deren Profaktoren, nämlich die Faktoren VIII und V, reguliert (Esmon, 2003). Seine herausragende Bedeutung im Gerinnungsprozess wird, wie bereits erwähnt, bei der Erkrankung Purpura fulminans deutlich, der ein homozygoter Mangel an Protein C zugrunde liegt (Griffin et al., 2007). In den letzten Jahren zeigte sich zudem, dass Protein C nicht nur gerinnungshemmende, sondern auch antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften besitzt (Grinnel und Joyce, 2001; Esmon, 2004, Schmidt-Suprian et al., 2000). Wie bereits unter Punkt 1.1 angeführt, stellt rekombinant erzeugtes und anschließend aktiviertes Protein C (Drotrecogin alpha) aufgrund dieser Kombination von Eigenschaften ein vielversprechendes Therapeutikum dar, welches in Deutschland seit 2002 eingesetzt wird (Laterre, 2007).

1.2.2.2 Die Aktivierung von Protein C

Protein C besteht aus einer schweren (41.000 Dalton) und einer leichten (21.000 Dalton) Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das Molekül besteht aus mehreren Domänen: zwei epidermal growth factor-like (EDGF) Domänen, einer Serinproteaseregion, einem kurzen Aktivierungspeptid und einer Gla-reichen Domäne. Die Gla-Domäne entsteht durch Vitamin K-abhängige posttranslationale Karboxylierung von Glutamatresten. Sie bindet Calcium und ist von entscheidender Bedeutung für die saubere Faltung des Moleküls. Eine Interaktion, die für die Funktion des Protein C eine entscheidende Rolle spielt, ist die Bindung der Gla-Domäne an negativ geladene Phospholipide und EPCR (siehe unten) (Dahlbäck und Villoutreix, 2005b).

Das Protein C-System beinhaltet eine Vielzahl von Proteinen, die an unterschiedlichen Stellen in den Reaktionsweg eingreifen. Es gibt Proteine, die für die Aktivierung zuständig sind, solche, die die Aktivität des APC modulieren und schließlich diejenigen, die die Aktivierung verhindern (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005b*). Zu einer Aktivierung des Protein C kommt es infolge der Bindung von Thrombin an endothelial gebundenes Thrombomodulin (TM). TM wirkt hierbei als Kofaktor und verstärkt die Aktivierungsrate um mehr als das 1000-fache (*Espana et al. 2002*). Eine weitere wichtige Rolle spielt der Endotheliale-Protein C-Rezeptor (EPCR), der, wie der Name schon impliziert, Protein C bindet. Auch er erhöht die Aktivierungsrate noch einmal um etwa das 20-fache. Diese Verstärkung der Protein C-Aktivierung resultiert daher, dass EPCR, der an die Gla-Domäne bindet, Protein C so ausrichtet, dass es anschließend durch den Thrombin-TM-Komplex aktiviert werden kann (*Esmon, 2003*). Zusätzlich wird die antikoagulatorische Aktivität des PC durch zwei weitere Faktoren verstärkt, dem Vitamin K-abhängigen Protein S und der intakten Form des Faktor V. Während Protein S zur Inaktivierung des Faktor Va genügt, wird zur Inaktivierung von Faktor VIIIa sowohl Protein S als auch Faktor V benötigt. Etwa 30-40% des Protein S befinden sich frei im Plasma, der verbleibende Rest ist an C4BP (C4-Bindungsprotein) gebunden. Nur die freie Form des Protein S fungiert als Kofaktor des APC (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005a*). Faktor V ist demnach ein Protein mit sowohl pro- als auch antikoagulatorischen Eigenschaften – abhängig davon, ob Thrombin oder Protein C den Faktor proteolysieren (*Emmerich et al., 1994*).

Anhand von in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass Faktor VIIIa resistent gegen die Inaktivierung von aktiviertem Protein C ist, wenn nicht alle Kofaktoren an der Reaktion teilhaben (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005b*). Während der Aktivierung von Protein C durch den Thrombin-TM-EPCR-Komplex kommt es zur Abspaltung eines Aktivierungspeptids, woraufhin die Serinprotease in ihre aktive Form, sprich in aktiviertes Protein C (APC) umgewandelt wird (*Esmon, 2004*). Sobald Thrombin an Thrombomodulin gebunden hat, verliert es seine prokoagulatorischen Eigenschaften, da TM die funktionell wichtige Exosite I des Thrombins besetzt und damit weitere Interaktionen mit anderen Proteinen verhindert (*Rezaie, 2003*). Der T-TM-Komplex aktiviert nicht nur Protein C, sondern auch TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis activator), einen Inhibitor der Fibrinolyse. TAFI zirkuliert im Blut als Proenzym, das nach seiner Aktivierung als Carboxypeptidase B C-terminale Lysinreste von Fibrin abspaltet (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005b; Dempfle 2007*).

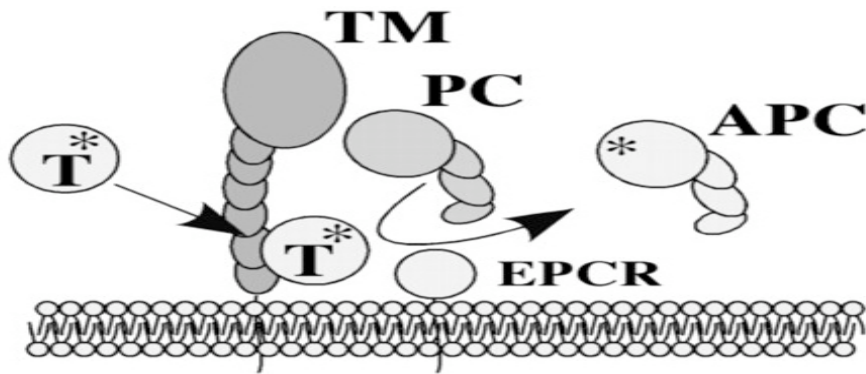


Abb. 3: Aktivierung von PC durch Thrombin (T), gebunden an die EGF 5 und 6 Domänen des Thrombomodulin (TM). Der Endotheliale-PC-Rezeptor (EPCR) bindet an die Gla-Domäne des PC, woraufhin es zu dessen Aktivierung kommt (APC).

Aus: Dahlbäck B und Villoutreix BO; *The anticouagulant protein c pathway*, 2005

1.2.2.3 Die Wirkung von APC

APC ist ein hochspezialisiertes Enzym, das selektiv nur bestimmte Peptidbindungen der Faktoren V/Va und VIII/VIIIa spaltet. Faktor V und VIII sind sich gleichende Moleküle, deren Gemeinsamkeit die Domänen A1-A2-B-A3-C1-C2 sind. Bei Faktor Va gibt es drei Positionen, an die APC angreift: Arg 306, Arg 506 und Arg 679. Diese Spaltstellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kinetik, ihrer verbleibenden Aktivität nach der Spaltung und dem Bedarf von Kofaktoren (Dahlbäck und Villoutreix, 2005b).

Die Spaltung an Arg 306 ist charakterisiert durch eine langsame Kinetik, eine starke Stimulation durch Protein S, einen enormen Aktivitätsverlust des Faktor Va und das Vorhandensein negativ geladener Phospholipide. Zu einem kompletten Verlust der Faktor Va-Aktivität kommt es, wenn die A2-Domäne bei der Spaltung an Arg 306 dissoziiert. Die Spaltselle an Arg 506 weist hingegen eine wesentlich schneller Kinetik auf, kann inhibiert werden durch das Vorhandensein von Faktor Xa gebunden an Faktor Va und resultiert in nur einem partiellen Aktivitätsverlust (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a). Die Regulation des Faktor VIIIa ist wesentlich komplexer und benötigt, wie schon erwähnt, nicht nur Protein S als Kofaktor, sondern auch Faktor V. Gespalten wird, unter Vorhandensein von Calcium und Phospholipiden, an Arg336 und Arg562. Eine mögliche Erklärung für die wesentlich komplexere Reaktion und das nötige Vorhandensein zweier Kofaktoren könnte sein, dass die Konzentration von Faktor V/Va ungleich höher ist als die von Faktor VIIIa, der als Substrat des APC ebenso um die Bindung kompetetiert. Faktor V

muss durch APC an Arg 506 gespalten werden, um seine Rolle als Kofaktor ausüben zu können. Wichtig für seine Funktion ist auch, dass die Bindung zwischen B-A3 intakt ist (Thorelli *et al.*, 1999). Wird Faktor V durch Thrombin aktiviert, so kommt es zu einer Durchtrennung der B-A3-Bindung und damit zu einem vollständigen Funktionsverlust als Kofaktor (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

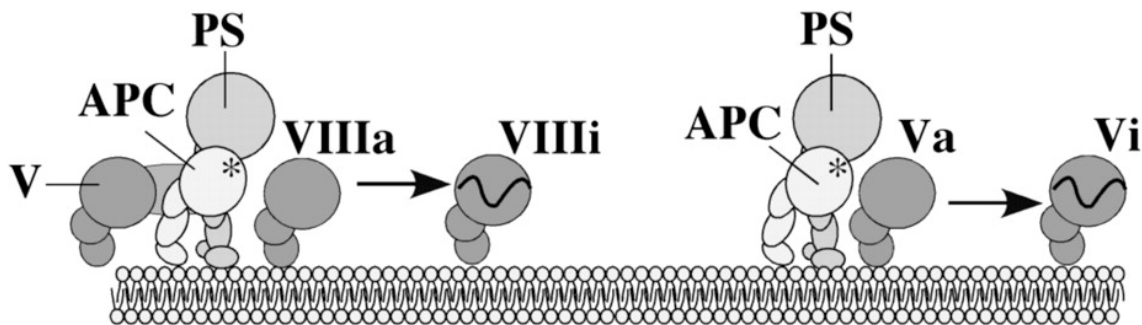


Abb. 4: Inaktivierung von FVIIIa und FVa durch APC. APC-Kofaktoren sind Protein S (PS), sowohl bei FVIIIa als auch FVa, sowie FV bei der Inaktivierung von FVIIIa; i = inaktiviert. Aus: Dahlbäck B und Villoutreix BO; *The anticouagulant protein c pathway*, 2005

Auch Protein S ist ein Vitamin K-abhängig synthetisiertes Protein. Es besteht aus einer N-terminalen Phospholipid-bindenden Gla-Domäne, einer thrombinsensitiven Region (TSR), vier EGF-ähnlichen Domänen und zwei Laminin G-Typ-Domänen (LamG). Protein S hat eine hohe Affinität zu negativ geladenen Phospholipiden und bildet einen membrangebundenen Komplex mit APC. Hierbei spielen die Gla-Domäne, die TSR sowie die EGF1 und 2 eine wichtige Rolle. Um eine funktionelle Verbindung zwischen dem aktiven Zentrum des APC und den Spaltstellen der Faktoren Va und VIIIa herstellen zu können, muss das Protein S die Distanz zwischen dem aktiven Zentrum und der Phospholipidmembran reduzieren. Maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind die beiden LamG-Domänen (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

PC hat nicht nur antikoagulatorische Eigenschaften, sondern ist auch bei antiinflammatorischen und antiapoptotischen Prozessen von Bedeutung (Toltt *et al.*, 2008). In-vitro Studien zeigen, dass die antiinflammatorische Wirkung des APC auf einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten, einer Blockierung der Interaktion zwischen Neutrophilen und Selektinen sowie auf der Unterdrückung der Expression von Leukzytenadhäsionsmolekülen in Endothelzellen beruht (Liaw, 2003). Bei einigen dieser Effekte ist die gleichzeitige

Anwesenheit von EPCR und dem membranständigen, G-Protein gekoppelten PAR-1 (protease activated receptor 1) nötig (*Riewald et al., 2002*). In einer großen Studie mit 1690 Patienten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinant hergestelltem APC (Drotrecogin alpha) bei schwerer Sepsis zu einer Minderung des relativen Todesrisikos um 19,4 % und zu einer Minderung des absoluten Todesrisikos um 6,1% führte (*Bernard et al., 2001; Dahlbäck und Villou-treix, 2005a*).

Im Vergleich zu vielen anderen Proteasen hat APC mit etwa 15-20 min eine relativ lange Plasmahalbwertszeit. Im Plasma wird es unter physiologischen Bedingungen von mindestens vier Proteaseinhibitoren inaktiviert. Hierzu gehören der Protein C-Inhibitor (PCI), α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT), α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) und α_2 -Makroglobulin (α_2 M) (*Gruber und Griffin, 1992; Esmon, 2001*). Der Mechanismus der Protease-Inhibition kann vereinfacht als zweistufiger Prozess aufgefasst werden: Zunächst kommt es zu einer Komplexbildung zwischen der Protease und ihrem Inhibitor, bei der der reaktive center loop (RCL) des Inhibitors als Substrat erkannt wird. Anschließend bildet sich ein kovalenter Komplex, bei dem die Protease in ihre inaktive Form überführt wird (*Rau et al., 2007*).

1.2.2.4 Die Störung des Systems

Die lebenswichtige Funktion des Protein C und seiner Komponenten offenbart sich bei Defekten dieses Systems. Störungen können vielfältig sein und sind meist mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombosen verbunden (*Liaw, 2003*). In der Mehrzahl der Fälle ist die Störung auf eine Resistenz des Faktor V gegenüber APC zurückzuführen, was durch die sogenannte Faktor V Leiden-Mutation verursacht wird. Bei dieser Mutation handelt es sich überwiegend um eine autosomal-dominant vererbte Punktmutation R506Q des Faktor V (*Segers et al., 2007*). Circa 30% aller Thrombosepatienten leiden unter einer meist heterozygoten Form dieser Mutation. Aufgrund der Mutation im Faktor V-Gen kommt es zu einer verminderten Ansprechbarkeit des Faktor V gegenüber aktiviertem Protein C, was wiederum zu einer gestörten Inaktivierung des Gerinnungsfaktors führt (*Cooper und Rezende, 2007*). Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation an Position 1691 des codierenden Genlocus. Folge dieses Basenaustausches ist der Ersatz der Aminosäure Arginin durch Glutamin in Position 506 (*Shaw, 2006*). Die prokoagulatorische Aktivität wird hiervon nicht beeinträchtigt. APC spaltet den aktivierten Faktor V an den Arginin-Bindungsstellen 306, 506 und 679. Durch die Spaltung an Arg-506 werden die beiden anderen

Bindungsstellen zugänglich. Da sich die geschwindigkeitsbestimmende Spaltstelle des Faktor Va jedoch genau an der Stelle des Aminosäureaustauschs befindet, kommt es zu einer bis zu zehnmals langsameren Inaktivierung (Pötzsch *et al.*, 2006), die eine unzureichende Inaktivierung des Faktor Va sowie eine erhöhte Gerinnungsfähigkeit des Blutes nach sich zieht. Darüber hinaus kann Faktor V nicht mehr als Kofaktor bei der Inaktivierung von Faktor VIIIa fungieren. Die Mutation ist etwa 30.000 Jahre alt und beruht auf einem Gründer-Effekt. Betroffen sind hauptsächlich Weiße, Asiaten und Afrikaner hingegen fast nie (De Stefano *et al.*, 1998). In Europa zeigt sich auf das Auftreten der Mutation bezogen ein deutliches Nord-Süd-Gefälle mit einer Prävalenz von etwa 10-15% im Norden und 2% im Süden (Montiel-Manzano *et al.*, 2003). Bei Patienten mit einer Mutation besteht kein erhöhtes Risiko für eine arterielle Thrombose, während das für venöse Thrombosen bei Homozygoten um etwa das 50-fache und bei Heterozygoten um etwa das 5-fache erhöht ist. Während der Evolution muss diese Mutation den Menschen einen Überlebensvorteil erbracht haben, der die hohe Prävalenz in manchen Bevölkerungsschichten erklärt. Frauen mit einer Faktor V Leiden-Mutation haben beispielsweise während der Geburt eine geringere Blutungsneigung (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

1.2.3 Aptamere

1.2.3.1 Einleitung

Aptamere sind synthetisch hergestellte, kurze, einzelsträngige RNA- oder DNA-Moleküle, die sich in charakteristischer, dreidimensionaler Struktur falten und damit spezifisch und hoch affin an bestimmte Strukturen von Proteinen beziehungsweise Zielmoleküle binden (Proske *et al.*, 2005). Automatisierte Herstellungsmethoden ermöglichen es, schnell RNA- und DNA-Sequenzen zu entwickeln, die mit nanomolarer Affinität und hoher Spezifität an eine Vielzahl von extrazellulären oder auch intrazellulären Moleküle binden. Aptamere weisen nicht nur herausragende Bindungseigenschaften auf, sie sind auch in der Lage, Funktionen ihrer Zielmoleküle zu modulieren beziehungsweise zu inhibieren. Gegenüber herkömmlichen Antikörpern mit ihren hypervariablen Regionen, die lediglich an definierte Epitope des jeweiligen Zielmoleküls binden können, haben Aptamere den Vorteil, dass sie zwischen größeren, strukturierten Regionen diskriminieren können (Mayer *et al.*, 2007). Ihr Bindungsverhalten gegenüber dem Zielmolekül, ihre Vorteile im Herstellungsprozess und ihre nicht-toxischen Eigenschaften machen Aptamere zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung von klinisch einsetzbaren Medikamenten (Dollins

et al., 2008; *Famulok et al.*, 2007). Die ersten Aptamere wurden unabhängig voneinander von den Arbeitsgruppen Ellington und Szostak sowie Tuerk und Gold beschrieben (*Ellington et al.*, 1990, *Tuerk et al.*, 1990). Innerhalb der letzten 18 Jahre wurden gegen eine Vielzahl von Zielmolekülen (besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang Aminosäuren, Proteine, Peptide oder aber kleine organische Moleküle) Aptamere entwickelt (*Geiger et al.*, 1996; *Lupold et al.*, 2002; *Mannironi et al.*, 1997; *Nieuwlandt et al.*, 1995).

Günstige Eigenschaften der Aptamere sind ihre hohe Spezifität und Affinität, durch die sie beispielsweise in der Lage sind, zwischen sehr ähnlichen Proteinen und sogar zwischen Peptidenatomen unterscheiden zu können (*Michaud et al.*, 2003). Zusätzlich besitzen sie die Fähigkeit der gezielten Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen. Für die therapeutische Anwendung sprechen Charakteristika wie ihre chemische Stabilität, ihre geringen Immunogenität und ihre Fähigkeit, Zielmoleküle selektiv zu inhibieren. Bis zur Erfindung der Aptamergenerierung durch das SELEX-Verfahren (siehe 1.2.3.2) dauerte es mehrere Monate, um ein Aptamer mit den gewünschten Eigenschaften entwickeln zu können. Aufgrund des automatisch durchführbaren Selektionsprozesses ist es mittlerweile möglich, Aptamere schnell und kostengünstig durch in-vitro Selektion herzustellen.

1.2.3.2 *Herstellungsverfahren und Modifizierung*

Die Herstellung von Aptameren mit den gewünschten Eigenschaften erfolgt über einen in-vitro Selektionsprozess, SELEX (Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification). Bedingt durch die dreidimensionale Form einzelsträngiger Oligonukleotide kommt es zu einer selektiven Interaktion zwischen den Nukleinsäuren und dem Zielmolekül.

Die Methode lässt sich grob in drei Reaktionsschritte untergliedern, die zyklisch wiederholt werden. Zunächst wird eine Nukleinsäurebibliothek, bestehend aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Oligonukleotide, mit dem Zielmolekül inkubiert. Oftmals setzt sich die Nukleinsäurebibliothek aus bis zu 10^{16} unterschiedlichen Molekülen zusammen. Die Kenntnis über die Amplifikations- beziehungsweise Transkriptionsregionen am 5'- und 3'-Ende ermöglicht unter Verwendung entsprechender Primer die gezielte Amplifikation des gewünschten Oligonukleotids. Die verschiedenen Moleküle konkurrieren untereinander um das Zielmolekül, wobei sich diejenigen mit der höchsten Affinität durchsetzen (Selektion). Nächster Schritt der SELEX ist die Entfernung ungebundener Nukleinsäuren und die Isolation gebundener Nukleinsäurespezies durch mehrere Waschschriffe (Separation). Nun werden die Nukleinsäuren, die am besten mit

mehrere Waschschriffe (Separation). Nun werden die Nukleinsäuren, die am besten mit dem Zielmolekül interagieren, enzymatisch amplifiziert (Amplifikation). Die Amplifikation erfolgt bei RNA-Aptameren mittels reverser Transkriptase und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dieser Kreislauf der Selektion-Separation-Amplifikation wird zehn- bis fünfzehnmal wiederholt, bis schließlich Aptamere generiert werden, die sehr spezifische Bindungseigenschaften aufweisen.

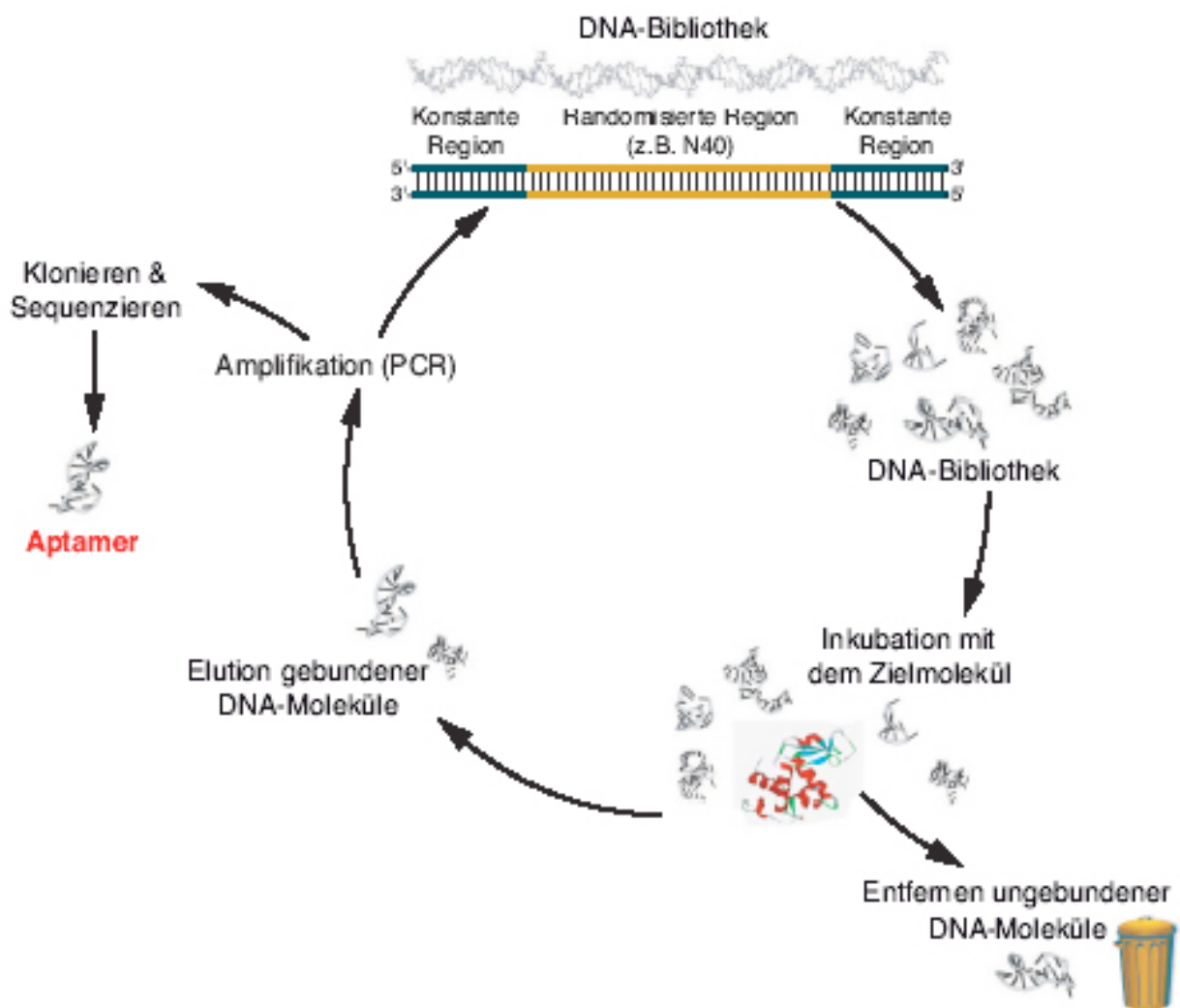


Abb. 5: Schematisch vereinfachte Darstellung eines Selektionszyklusses
 Modifiziert nach: Mayer G, Famulok M; Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche, Pharm. Unserer Zeit 6/2007

Diese spezifischen Bindungseigenschaften beruhen in erster Linie auf der dreidimensionalen Passgenauigkeit zwischen Aptamer und Zielstruktur. Es spielen jedoch auch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und van-der-Wals-Kräfte eine Rolle (*Stull et al., 1995*). Das nun entstandene Aptamer kann entsprechend seiner gewünschten Funktion modifiziert werden (*Burgstaller et al., 2002*). Auf diese Weise werden seine Eigenschaften den Erfordernissen der jeweiligen Anwendungsgebiete spezifisch angepasst.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Modifikation. Beispielsweise können verschiedene Funktionalitäten wie Affinitätsmarker, Aminosäuren, Biotin und fluoreszierende Gruppen an die Aptamere gekoppelt oder auch andere chemische Veränderungen vorgenommen werden (*Mayer et al., 2007*). Ein weiterer Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern ist, dass Erstere aufgrund ihrer Nukleinsäurenatur chemisch-synthetischen Prozessen leicht zugänglich sind. Bei der Entwicklung von Therapeutika stellte sich als Problem heraus, dass Aptamere – vor allem RNA-Aptamere – eine geringe Stabilität gegenüber körpereigenen Nukleasen aufweisen (*Mayer et al., 2007*). Nukleasen sind Enzyme, die ubiquitär im Körper vorkommen und Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen hydrolytisch spalten können. Man unterscheidet dabei zwischen Exonukleasen, die am 3'- beziehungsweise 5'-Ende spalten, und Endonukleasen, die innerhalb einer Nukleinsäurekette angreifen. Ihre Substratspezifität und die Form der Schnittstelle sind weitere Unterscheidungsmerkmale (*Worrall et al., 2007*).

Aptamere werden im Organismus durch hydrolytische Spaltung rasch zerstört und eliminiert. Aufgrund dieser Tatsache ist es nötig, therapeutisch wirksame Aptamere gegen Nukleasen zu schützen. Die Modifikation der 2'-OH-Position erwies sich als der am wirksamste Schutzmechanismus. Schon das Anhängen einer 2'-Fluoro-, 2'-Amino- oder 2'-O-Methyl-Gruppe an eine Pyrimidinbase steigerte die Stabilität gegenüber Nukleasen signifikant (*Burmeister et al., 2005; Gold et al., 1995*). Einen weiteren Stabilitätsgewinn erbrachte das Anhängen einer Kappe am 3'-Ende. Die Halbwertszeit in-vivo kann durch diese Modifikationen erheblich verlängert werden, wobei die Funktion der Aptamere unbeeinträchtigt bleibt (*Mayer et al., 2007*). Als problematisch stellte sich heraus, dass Aptamere wegen ihrer geringen Größe (5-25 kD) durch renale Clearance schnell aus dem Körper ausgeschieden wurden. Um dies umgehen und die Bioverfügbarkeit erhöhen zu können, wurden die Aptamere an Ankerproteine gekoppelt. Als Anker dienten hierbei Cholesterin oder Polyethylenglykol (*Rusconi et al., 2004*).

1.2.3.3 Aptamere in Diagnostik und Therapie

Aptamere verlieren ihre Bindungseigenschaften auch dann nicht, wenn sie an Trägermaterialien gebunden, mit funktionellen Gruppen markiert oder aber in Zellen übertragen werden (*Blind et al., 2002; Farokhzad et al., 2004*). Diese Charaktereigenschaften prädisponieren Aptamere als vielversprechendes Werkzeug in der Biotechnologie. Die Einsatzgebiete sind vielfältig und erstrecken sich von der Grundlagenforschung bis zu applikationsbasierten Entwicklungen. Ein verheißungsvolles Gebiet stellt auch die Diagnostik sowie die Therapie von Erkrankungen dar.

Mit Macugen[®] (Pegaptamib sodium injection) wurde im Jahr 2004 das erste auf RNA-Aptameren basierende Medikament zugelassen – zunächst in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) und wenig später auch vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Pegaptimab bindet hochspezifisch an die Isoform VEGF₁₆₅ des Wachstumsfaktors Vascular Endothelial Growth Factor und inhibiert dessen Wirkung. Zugelassen wurde das Medikament zur Therapie der altersbedingten Maculadegeneration (AMD). Da es die choroidale Neovaskularisation hemmt, nimmt es eine zentrale Rolle in der Therapie von Augenerkrankungen, die durch Gefäßneubildungen bestimmt sind, ein (*Jellinek et al., 1994*).

Wie schon unter Punkt 1.2.3.2 erwähnt, ist die Halbwertszeit der Aptamere im Organismus gering. Durch die Modifikation mit einem 40 kD großen Polyethylenglycolanker am 5'-Ende des Aptamers und einer 3'-3'-Desoxythymidin-Kappe zum Schutz gegen Exonukleasen wird sie, wie dies bei Pegaptimab der Fall ist, jedoch verlängert (*Bozza et al., 2006*). Hierdurch kann eine Halbwertszeit im Auge von 10 ± 4 Tagen erreicht werden (*Mayer et al., 2007*). Neben Pegaptimab wird eine Vielzahl anderer Medikamente auf Aptamerbasis in klinischen oder präklinischen Studien getestet. Hervorgehoben seien hier exemplarisch das Aptamer ARC1 779 gegen den vWF, das Aptamer NU172 gegen Thrombin sowie das Aptamer REG1 gegen Faktor IXa. Mögliche weitere Anwendungsgebiete sind die Erkennung und Therapie von Krebserkrankungen, die akute myeloische Leukämie sowie die Diagnostik und Behandlung viraler Erkrankungen (*Buerger et al., 2003, Chu et al., 2006, Ferreira et al., 2006; James, 2007*). Vielversprechend ist auch die Verwendung von Aptameren als potente Antikoagulantien. Besonders bei großen Operationen wie beispielsweise Herzoperationen, bei denen der Blutkreislauf über eine Herz-Lungen-Maschine extrakorporal umgeleitet wird, bietet sich die Gabe von Aptamere mit antikoagulatorischer Wirkung an. In dem Zusammenhang ist es von großem Nutzen, dass die Aptamere sowohl schnell und effektiv wirken als auch aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Nukleinsäuren wirksam neutralisiert werden können. Gerade bei sensibel ausgeglichenen Prozessen wie der Blutge-

rinnung ist es sehr vorteilhaft, wenn ein Therapeutikum durch die Gabe eines Antidots antagonisiert werden kann, um damit die Gefahr eines Ungleichgewichtes beziehungsweise behandeln zu können. Das Antidot besteht aus der Antisense-Struktur des eigentlichen Aptamers und kann aufgrund der komplementären Watson-Crick Basenbindung die Funktion und Struktur des Aptamers nachhaltig beeinflussen. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Gabe eines Antisense-Moleküls die antikoagulatorische Aktivität eines Aptamers gegen Faktor IXa antagonisiert werden kann (*Rusconi et al., 2004*). Ein weiteres Beispiel für ein antikoagulatorisch wirksames Aptamer ist das Thrombin-bindende und -inhibierende Aptamer. Dieses Aptamer besitzt am 5'-Ende einen Antisense-Strang. Die Bildung komplementärer Basenpaare wird von einer photolabilen Schutzgruppe verhindert, die allerdings durch Belichtung entfernt werden kann. Infolge der quantitativen Entfernung der Schutzgruppe wird die Antidotaktivität des Antisense-Stranges freigesetzt und eine Basenpaarung der komplementären Stränge ermöglicht. Dieses Aptamer vereint damit sowohl antikoagulatorische Eigenschaften sowie – je nach Belichtungsstatus – Antidotaktivität (*Heckel et al., 2006*). Bezeichnenderweise binden Aptamere zwar mit hoher Spezifität und Sensivität an ihre Zielmoleküle. Sie besitzen aber, selbst bei Darreichung in therapeutischen Dosen, aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Ähnlichkeit mit körpereigenen Substanzen geringe bis keine antigenen Eigenschaften. Klinische Studien konnten zeigen, dass Aptamere nicht-immunogene und nicht-toxische Moleküle sind (*Eyeteck Study Group 2002; 2003*).

In der Diagnostik kommt Aptameren in ihrer Funktion als Hilfsmittel große Bedeutung zu (*Brody et al., 1999*). Sie dienen beispielsweise zur Charakterisierung von Biomolekülen (Target-Validierung), werden aber auch als Werkzeuge bei der Identifizierung von kleinen organischen Substanzen im Rahmen der Hochdurchsatzanalyse erfolgreich verwendet (*Burgstaller et al., 2002; Mayer et al., 2007*). Sowohl in ELISA-Assays als auch in der Durchflusszytometrie hat sich der Gebrauch von Aptameren als diagnostisches Hilfsmittel bewährleistet (*Baldrich et al., 2004; Blank et al., 2001*). Weitere Anwendungsgebiete sind die Reinigung, Separation und Funktionsanalytik von Proteinen sowie die Verwendung von Aptameren in einem Microarray mit einer im Vergleich zu herkömmlichen Microarrays niedrigen Nachweisgrenze, einer großen dynamischen Nachweisbreite und einer geringen Anzahl an falsch negativen Signalen (*Roming et al., 1999; Petach und Gold, 2002*).

1.2.3.4 Aptamere gegen APC

Erstmals wurde 1998 von Gal und Nishikawa ein Aptamer beschrieben, das spezifisch an APC bindet und dessen Funktion als Serinprotease inhibiert (*Gal et al., 1998*). Dieses RNA-Aptamer besteht aus 167 Basen und weist eine Bindungskonstante von $K_d = 110$ nM auf. Im Rahmen der Minimierung dieses Aptamers wurde ein weiteres RNA-Aptamer entwickelt, das ebenso spezifisch an APC bindet, aber eine etwas höhere Bindungsaffinität aufweist ($K_d = 120$ nM) und aus nur 99 Oligonukleotiden besteht. Beide Aptamere verfügen über mehrere *stem-loop* Strukturen. Anhand von enzymkinetischen Versuchen, bei denen der Umsatz eines chromogenen, durch APC hydrolysierten Substrats gemessen wurde, ermittelte man den Einfluss der Aptamere auf die enzymatische Aktivität des APC. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass beide Aptamere nicht-kompetitive Inhibitoren sind und sich die Bindungsstelle der Aptamere von der Substratbindungsstelle unterscheidet.

Am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn wurde im Jahr 2007 in Zusammenarbeit mit dem Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie mit Hilfe des SELEX-Verfahrens DNA-Aptamere selektioniert, die spezifisch und hoch affin an APC binden. Als APC-Vorlage diente in diesem Verfahren das rekombinant hergestellte Medikament Xigris[®]. In 12 Zyklen konnte eine Vielzahl von APC-bindenden Aptameren identifiziert werden, die eine gemeinsame, 14-Basen lange Konsensussequenz aufwiesen. Von diesen Aptameren wurden vier verschiedene Monoklone mit den Namen HS02, HS03, HS04 und HS08 auf ihre Bindungsaffinität bezüglich APC untersucht (*Salehi, 2007*). Aufgrund der Tatsache, dass das Aptamer HS02 im Vergleich zu den anderen Aptameren die geringste Dissoziationskonstante (K_D) und deshalb die höchste Bindungsaffinität zu APC besitzt, wurde es als Basis zur Erstellung eines Minimalmotivs verwendet. Ausgehend von der aus 88 Basen bestehenden Originalsequenz begann man, das Aptamer sowohl am 5'- als auch 3'-Ende zu verkürzen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Verkürzung bis zu einer Länge von 44 Basen möglich war, bevor eine Minderung der Wirksamkeit eintrat. Bei einer weiteren Verkürzung käme es zu einer Schwächung der die Konsensussequenz stabilisierenden Stammsequenz (*Salehi, 2007*).

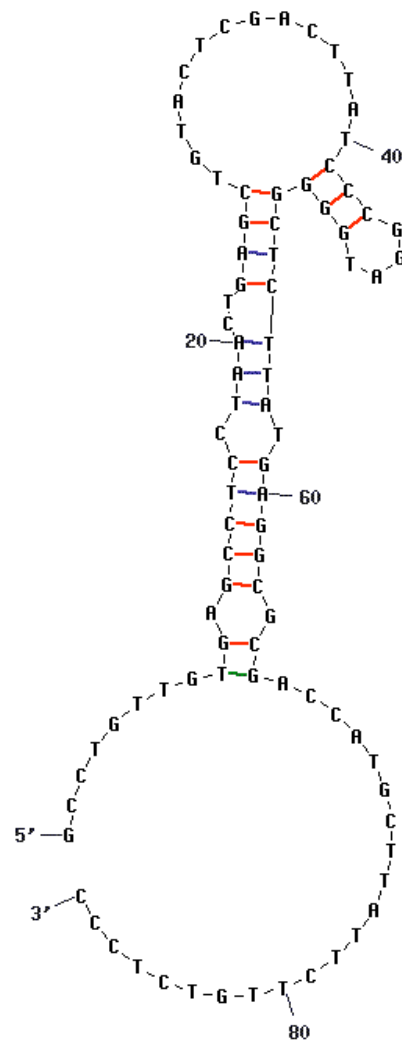


Abb. 6: Darstellung des aus 88 Basen bestehenden HS02-Aptamers

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Seit der Einführung von Xigris® (Drotrecogin alpha) im Jahr 2002 besteht die Möglichkeit, Patienten, die an einer schweren Sepsis leiden, mit rekombinantem humanem APC zu therapieren. Diese Therapieentscheidung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Protein C-Gehalt im Plasma bei einer schweren Sepsis signifikant abfällt und dass dieser Abfall mit einer steigenden Mortalität einhergeht (*Fisher et al., 2000; Dhainaut et al., 2004*). Der Abfall des Protein C-Gehalts kann zügig voranschreiten und teilweise auch schon vor der Manifestation von Symptomen einer Sepsis eintreten (*Fisher et al., 2000*). Ferner zeigte sich, dass der Gehalt an Kofaktoren bei der Aktivierung von Protein C herunterreguliert wurde. Die Expression von TM und EPCR beispielsweise kann durch Zytokine wie den Tumornekrosefaktor α und Interleukin 1β vermindert werden (*Fukudome und Esmon, 1994*). Anhand dieser Tatsache und den bereits erläuterten positiven Eigenschaften des aktivierten Protein C zeigt sich, dass die Bestimmung der endogenen Plasmakonzentration von APC von großem Vorteil ist. Zum einen ist sie von vitalem Nutzen für an einer Sepsis erkrankte Patienten, zum anderen ist sie wesentlich, um bei Gerinnungsstörungen die Ursache ermitteln und eine adäquate Therapieentscheidung im Sinne einer optimalen klinischen Behandlung der Patienten treffen zu können. Des Weiteren wäre ein APC-Assay für die Überwachung von Dauer und Dosis der Therapie mit rekombinantem humanem APC von großem Nutzen. Trotz der enormen physiologischen und pathophysiologischen Relevanz des APC gibt es bislang kein zuverlässiges Testverfahren zur schnellen und sicheren Quantifizierung der endogenen APC-Konzentration.

Zur besseren Charakterisierung des APC einerseits und zum genaueren Verständnis der molekularen Wechselwirkungen des APC mit anderen biologischen Substraten andererseits wurden mit Hilfe des SELEX-Verfahrens einzelsträngige DNA-Aptamere selektiert, die mit hoher Affinität und Spezifität an APC binden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Aufbau und Validierung eines oligonucleotide assay zum Nachweis von aktiviertem Protein C beschrieben werden.

2 Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl_2)

Fluka Chemie GmbH, Buchs (Schweiz)

Natriumchlorid (NaCl)

KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar

Natronlauge (NaOH) 1mmol/l

Salzsäure (HCl) 1mmol/l

Merck GmbH, Darmstadt

Magnesiumchlorid-Dihydrat (MgCl_2)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

Tris-HCl 1 M (pH = 8,0)

2.1.2 Verwendete Reagenzien

American diagnostica Inc., Stamford (USA)

human protein C depleted plasma

rabbit lung thrombomodulin

fibrin polymerization inhibiting peptide (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH.AcOH)

AppliChem GmbH, Darmstadt

Streptavidin ultrapure

Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Ceprothin® (1000 U gelöst zu 100 U/ml)

Bayer AG, Leverkusen

Trasylol® 0,5 (konzentrierte Aprotininlösung)

Bayer Health Care AG, Leverkusen

Refludan® (Hirudin)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Pefabloc® CS-Protease-Inhibitor

Eli Lilly Export S.A., Genf (Schweiz)

Xigris® (Drotrecogin alpha)

Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

Aqua dest.

Ampuwa®

in-house Produktion

Poolplasma (gepooltes Citratplasma)

Invitrogen, Karlsruhe

Dynabeads M-280 Streptavidin

Mycrosynth Laboratory, Balgach (Schweiz)

3'-biotinyliertes HS02-88-Aptamer, ssDNA-oligonucleotide, Page gereinigt

Sequenz:

5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTGAGCTGTACTCGACTTATCCCGGATGGGGCTCTT
ATGAGGCGCGACCATGCTTATTCTTGTCTCCC-3'-Biotin

Pentapharm, Basel (Schweiz)

Pefalour PCa (Pefa-5791)

Pefalour PCa 3342 (Pefa-3342)

Perbio Science, Bonn

NHS-Biotin

Siemens Healthcare Diagnostics (DADE Behring), Eschborn

Testkit zur Bestimmung der TAT-Komplexe

Standardproben zur Bestimmung des Prothrombinfragments F1+F2 (Enzygnost F 1+2)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Tween 20

Albumin from bovine serum, min. 98 % (BSA)

Human α -Thrombin (3,800 NIH units/mg)

Thrombinoscope B.V., Maastricht (Niederlande)

TF-Reagenz (25 pM TF, 20 pM Phospholipide, PPP-Reagenz)

2.1.3 *Verwendete Pufferlösungen*

Tris-Puffer: 10 mM Tris
 50 mM NaCl
 1 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 0,1 % Tween 20
 pH = 8,0

Verdünnungspuffer: 0,1 % BSA
In Tris-Puffer (1x)

Blockpuffer: 2 % BSA
0,1 % Tween 20
In Tris-Puffer (1x)

Coating-Puffer: 30 mM Na_2CO_3
200 mM NaHCO_3
pH = 9,0

2.1.4 Verwendete Materialien

Eppendorf GmbH, Hamburg

Reaktionsgefäße, verschieden Größen

Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden

Flourownunc 96-well Mikrotiterplatten (weiß)

Sarstedt AG & CO, Nümbrecht

S-Monovetten[®], neutral (ohne Füllung)

S-Monovetten[®] EDTA

S-Monovetten[®] Citrat

2.1.5 Verwendete Geräte

BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall

Plattenfluorometer FLX 800

Cenco Instrumenten B.V., Breda (Niederlande)

Vortex-Gerät

Eppendorf GmbH, Hamburg

Tischzentrifuge 5804

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgweder

Wasserbad GLF (37°C)

Gilson International B.V., Limburg-Offheim

Kolbenhubpipetten (10µl-1000µl)

Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Messwaage, digital Mettler PL1200

Metrohm Deutsche GmbH & Co, Filderstadt

pH-Meter 744

Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden

Plattenfluorometer FlouroScan

SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim

Tecan SLT-washer für Mikrotiterplatten

2.2 Methodik

2.2.1 Methode und Ablauf des APC-Assays

Ziel des Aufbaus des APC-Assays soll die schnelle und zuverlässige Bestimmung der APC-Konzentration in Plasmaproben sein. Um dies verwirklichen zu können, wurde der Umsatz eines fluorogenen Peptidsubstrats durch APC mit Hilfe eines Plattenfluorometers gemessen.

Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität von APC erfolgte unter Verwendung eines synthetischen Peptidsubstrats, das aufgrund der enzymatischen Aktivität des APC gespalten wurde. Diese Substrate sind kurzkettige Peptide, die in der Regel aus drei bis fünf Aminosäuren bestehen und mit einem Indikator versehen sind. Als Indikator diente die flourogene Gruppe 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC). Die Auswahl und Anordnung der Aminosäuren bestimmt die Spezifität des Peptidsubstrats gegenüber dem Zielenzym. Infolge der proteolytischen Spaltung des Substrats mittels APC kommt es zu einer Freisetzung des Indikators, der anschließend photometrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 360$ nm sowie einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 460$ nm gemessen werden kann. Die Fluoreszenzemission je Zeiteinheit ist beim Vorliegen eines deutlichen Substratüberschusses proportional zur vorhandenen Menge an wirksamen Enzymen. Als fluorogenes Peptidsubstrat wurde Pefafloor Pca (Pefa-5791) von Pentapharm Ltd. verwendet. Es ist sensitiv für APC und besteht aus Pyrimidin-Prolin-Arginin-AMC-Acetat. Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt $K_M = 0,56$ mM und $k_{cat} = 62,0$ s⁻¹. Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität des APC erfolgte unter Zuhilfenahme eines automatischen ELISA-Prozessors. Die Fluoreszenzemission wurde in einem Zeitraum von 180 Minuten alle fünf Minuten automatisiert ermittelt. Durchgeführt wurde die Aktivitätsmessung an zwei verschiedenen Prozessoren: am Plattenfluorometer FLX 800 von BioTec Instruments einerseits und am Plattenfluorometer FlouroScan von NuncTM andererseits. Die Verwendung dieser beiden unterschiedlichen Messgeräte erklärt, weshalb im nachfolgenden Ergebnisteil für die Umsatzrate des fluorogenen Substrats je nach Versuch verschiedene Messwerte ermittelt wurden. Die Versuche 5 und 6, 9 und 10, 13 bis 15 sowie 19 bis 21 wurden mit Hilfe des Plattenfluorometer FLX 800 durchgeführt, die restlichen Experimente unter Verwendung des FlouroScan. Die Messung der APC-Konzentration fand in sogenannten Mikrotiterplatten statt. Diese Mikrotiterplatten bestehen aus 96 Vertiefungen (wells), in die die jeweiligen Flüssigkeiten pipettiert wurden.

Um eine Bindung der Aptamere in den wells gewährleisten zu können, mussten diese zunächst mit Streptavidin beschichtet werden, was folgendermaßen ablief:

1. Mischung von Streptavidin mit Coatingbuffer (10 µg/ml)
2. Einpipettieren von 100 µl pro well
3. Inkubation über Nacht bei 4°C
4. Automatisches dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte
5. Blocken mit Blockpuffer (200 µl pro well)
6. Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
7. Automatisches dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte
8. Nach dem Waschen besteht die Möglichkeit, die Mikrotiterplatte entweder direkt weiter zu verwenden oder aber sie bei - 40° C einzufrieren, um sie dann zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden.

Nach der Beschichtung der wells mit Streptavidin wurden die Aptamere, die beim Herstellungsprozess an ihrem 3'-Ende an Biotin gekoppelt wurden, in die wells pipettiert und für eine gewisse Zeit inkubiert. Zuvor erfolgte die Mischung der Aptamere mit Verdünnungspuffer, aus der sich unterschiedlich Konzentrationen ergaben. Durch die Kopplung mit Biotin kam es während der Inkubation zur Ausbildung von Streptavidin-Biotin-Verbindungen, sodass die Aptamere kovalent in den wells gebunden wurden.

In bereits vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Aptamer HS02-88 die besten Bindungseigenschaften gegenüber APC aufweist. Auf dieser Grundlage bauen die sich nun anschließenden Versuche auf (*Salehi, 2007*). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die nicht-gebundenen Aptamere automatisch in drei Waschzyklen ausgewaschen. Während dieser Waschzyklen wurden jeweils 400 µl Waschpuffer in die einzelnen wells gefüllt und auch wieder entfernt. Nächster Schritt des Versuchsablaufs war die Inkubation von APC in den Mikrotiterplatten. Die Flüssigkeit (Verdünnungspuffer, Citratplasma, Hirudinplasma), in der die APC-Konzentration gemessen werden sollte, wurde dabei mittels einer Pipette zu je 100 µl in die wells eingefüllt. Während der Inkubationszeit kam es zur Ausbildung von Bindungen zwischen dem APC und den immobilisierten Aptameren.

Um gewährleisten zu können, dass nach der Blutabnahme keine Inaktivierung des APC erfolgte, die zu einer Messung von falsch niedrigen Werten führen würde, wurden das Plasma in

den Proben mit konzentrierter Aprotininlösung (Trasylo[®] 0,5) versetzt. Aprotinin ist ein Polypeptid aus 58 Aminosäuren, das durch Bildung reversibler stöchiometrischer Enzym-Inhibitor-Komplexe als Hemmstoff von menschlichem Trypsin, Plasmin sowie Plasma- und Gewebekallikrein wirkt. Die Rolle des Aprotinins als Hemmstoff des Protein C-Inhibitors ist in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben. Die Plasmaproben wurden mit Hirudin versetzt, um die Wirkung von Thrombin zu hemmen und damit jegliche Aktivität desselben zu unterbinden. Durch besagte Hemmung der Thrombinaktivität mit Hilfe von Hirudin konnte sichergestellt werden, dass keine nachträgliche Aktivierung von Protein C in den Plasmaproben stattfand und folglich auch keine falsch hohen APC-Spiegel gemessen wurden.

Um die Ergebnisse der APC-Messungen im Plasma mit denen im Verdünnungspuffer vergleichen zu können, wurden dem Verdünnungspuffer Aprotinin und Hirudin in gleichen Konzentrationen wie im Plasma beigefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer beziehungsweise zwei Stunden wurde die Flüssigkeit durch drei automatischen Waschzyklen entfernt, sodass nur noch das an die Aptamere gebundene APC in den wells verblieb. Mit der nun folgenden Zugabe von Substratlösung kam es aufgrund des vorhandenen APC zu einer enzymatischen Spaltung derselben. Der Umsatz konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 460$ nm ermittelt werden.

Die Substratlösung wurde folgendermaßen hergestellt:

Substratlösung: Verdünnungspuffer
 + final 1 mM CaCl₂
 + final 1 mM MgCl₂
 + final 200 μ M Pefa-5791

Nach der Beigabe von Substratlösung wurde die enzymatische Aktivität des APC unter Verwendung des Plattenfluorometer automatisch ermittelt. Hierbei wurde das Fluorophor zunächst mittels einer Quarz-Halogenlampe über einen entsprechenden Extinktionsfilter bei einer Wellenlänge von $\lambda = 306$ nm angeregt. Die emittierte Strahlung wurde anschließend über einen Emissionsfilter an einen Photomultiplier weitergeleitet, der die Intensität der eintreffenden Strahlung in einen entsprechenden Spannungswert umsetzte. Wie bereits erwähnt, dauerte die Messung drei Stunden. Da alle fünf Minuten gemessen wurde, konnten 36 Messwerte ermittelt werden. Um die enzymatische Aktivität in den Versuchsansätzen zu quantifizieren, wurde jeweils eine Standard-

reihe mitgeführt, zu deren Erstellung die jeweils zugrundeliegenden Medien mit rekombinant hergestelltem APC (Drotrecogin alpha) versetzt wurden. Die Erstellung einer Standardgeraden ermöglichte es, die APC-Konzentrationen in den Versuchsansätzen zu errechnen.

Herstellung von Standardreihen:

Die Erstellung der Standardreihen erfolgte in dem Medium, in dem die APC-Konzentration ermittelt werden sollte, sprich im Verdünnungspuffer, Poolplasma, Hirudinplasma oder Protein C – Mangelplasma. Es wurden sowohl lineare als auch halblogarithmische Standardreihen verwendet, deren Herstellung manuell durch Pipettieren der jeweiligen Flüssigkeiten in einzelne Reaktionsgefäße stattfand.

2.2.2 Die Messung der Protein C-Aktivität

Die Bestimmung der Protein C-Aktivität erfolgt mit Hilfe des Geräts ACL-TOP I (hergestellt von Instrumentation Laboratory). Die Methode der Aktivitätserfassung beruht auf der enzymkinetischen Messung mittels eines Peptidsubstrates. Das in der Probe befindliche Protein C wurde durch einen Protein C-Aktivator, einer aus dem Kopf der Kupferkopfschlange gewonnenen Proteinfraction, angeregt. Die Quantifizierung des nun aktivierten Proteins erfolgte über die Hydrolyserate eines synthetischen chromogenen Substrats. Dabei wurde freigesetztes Paranitroanilin kinetisch erfasst. Es verhält sich direkt proportional zum Protein C-Spiegel in der zu bestimmenden Probe. Anschließend wurde die Konzentration des sich im Plasma befindlichen Protein C mit Hilfe einer Kalibrierungskurve automatisch vom Gerät bestimmt. Die Umrechnung der ermittelten Extinktion in Konzentrationsangaben wurde anhand von Standards durch das Gerät errechnet. Es gibt die Konzentration des Protein C in Prozent an.

2.2.3 Die Bestimmung des Protein C-Antigens

Die Konzentration von Protein C in Plasmaproben lässt sich durch Ermittlung des Protein C-Antigens bestimmen. Die Quantifizierung des Antigens fand mit dem Gerät Vidas (hergestellt von BioMérieux) statt. Der Test stellt ein modifiziertes ELISA-Verfahren dar. Beim Aufsaugen in die Pipettenspitze bindet das Protein C-Antigen an einen dort immobilisierten, monoklonalen anti-PC-Antikörper. Nach der Inkubation und dem ihr folgenden Waschschrift wird das Antigen an einen weiteren Antikörper gekoppelt, der zusätzlich mit einem Konjugat versehen ist. Es er-

folgen ein weiterer Waschschrift und eine erneute Inkubation. Der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex wird nun mit einem für das Konjugat spezifischen Substrat versetzt. Anschließend erfolgt die photomerische Messung des dabei entstehenden Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die jeweiligen Angaben der Antigenkonzentration wurden auf eine Standardreihe bezogen, automatisch umgerechnet und in Prozent angegeben.

2.2.4 Die Methode der Ceprotin-Aktivierung und der Vergleich mit Drotrecogin alpha

Um die Bindungsaffinität der Aptamere zwischen rekombinant hergestelltem APC (Drotrecogin alpha) und plasma-basiertem APC miteinander vergleichen zu können, wurde der unter Punkt 3.5 beschriebene Versuch durchgeführt. Zunächst musste jedoch ein humanes Protein C-Konzentrat aktiviert werden. Hierzu wurde als Erstes die Konzentration von Protein C in Ceprotin bestimmt, was zum einen mittels der Messung der Protein C-Aktivität und zum anderen mittels der des Protein C-Antigens geschah. Aus den Messergebnissen geht hervor, dass eine IU von Ceprotin $3,35 \pm 0,09 \mu\text{g}$ PC enthält. Dieses in Ceprotin befindliche PC wurde nun von immobilisiertem alpha-Thrombin aktiviert. 50 μg humanen alpha-Thrombins wurden durch einen 5-fachen Überschuss von NHS-Biotin biotiniert und an 10 mg mit Streptavidin beschichtete beads gebunden. Diese Thrombin-beads wurden bei Raumtemperatur mit 20 μg PC in einem Gesamtvolumen von 1 ml Bindungspuffer inkubiert. Die sich daraus ergebende Aktivierung des Protein C wurde mit Hilfe der amidolytischen APC-Aktivität und des verminderten Protein C-Antigens überprüft. Die komplette Aktivierung konnte innerhalb von fünf Minuten erreicht werden. Anschließend wurde das nun aktivierte Protein C aliquotiert und bei -70°C gelagert. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem unter Punkt 2.2.1 geschildertem APC-Assay.

2.2.5 Die Bestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe

Die koagulatorische Wirkung des Thrombins wird unter physiologischen Bedingungen von Antithrombin inaktiviert. Die dabei entstehenden Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) können gemessen werden und sind ein Biomarker für die Bildung und die darauf folgende Inaktivierung von Thrombin. Die Bestimmung der TAT-Komplexe ermöglicht eine genaue Aussage über die Regulationsfähigkeit der Thrombinbildung. Zudem kann eine hyperkoagulabile Stoffwechsellage erkannt werden. Im klinischen Alltag spielt dieses Messverfahren bisher eine untergeordnete Rolle und wird bevorzugt im Rahmen klinischer Studien und in der Grundlagenforschung ange-

wandt. Das Messverfahren beruht auf dem Prinzip eines Enzymimmunoassay und wurde durch das Gerät MRX-Reader von Dynatech Laboratories und den SLT-Washer von Tecan ausgeführt. Die Bestimmung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes erfolgte mittels eines auf dem Sandwich-Prinzip beruhenden Enzymimmunoassays. Die Plasmaprobe wurde in eine mit Antikörpern gegen Thrombin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Während der folgenden Inkubationszeit binden die vorhandenen TAT-Komplexe an die gegen Thrombin gerichteten Antikörper. Nach dreimaligem Waschen der mit der Probe beschichteten Platte kam es nach Gabe von Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes Antithrombin in einer zweiten Reaktion zur Bindung von Antithrombin mit den konjugierten Antikörpern. Es erfolgte nun wiederum eine Inkubation, die durch erneutes Waschen der Mikrotiterplatte beendet wurde. Nächster Schritt war die Anfärbung der vorhandenen Komplexe mit einem chromogenen Substrat. Zuletzt wurde nach 30-minütiger Inkubationszeit die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt und die Intensität der Farbstoffentwicklung gemessen, die proportional zu der in der Plasmaprobe vorhandenen TAT-Konzentration war. Ermittelt wurde die TAT-Konzentration bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 690$ nm. Die gemessenen Werte wurden an der zu jedem Test erstellten Standardkurve abgelesen und vom MRX-Reader automatisch umgerechnet. Die Angabe der TAT-Konzentration erfolgte in ng/ml. Die Standardkurve wurde mit den im Testkit enthaltenen Standardkonzentrationen erstellt. Letztere lagen in folgender Dosierung vor:

S1 = 2 ng/ml S2 = 6 ng/ml S3 = 10 ng/ml S4 = 60 ng/ml

2.2.6 Die Bestimmung des Prothrombinfragments F1 + F2

Die Bestimmung des Prothrombinfragments F1 + F2 beruht auf einem ähnlichen Verfahren wie das unter Punkt 2.2.5 beschriebene Verfahren der TAT-Komplex-Bestimmung und wurde mit denselben Geräten durchgeführt.

Bei der proteolytischen Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin kommt es zu einer Abspaltung des Prothrombinfragments F1 + F2 und zu dessen Freisetzung ins Plasma. Die Bestimmung des Biomarkers F1 + F2 ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Bildung von Thrombin zu ziehen. Dieses Messverfahren wird, genau wie die Bestimmung der TAT-Komplexe, in erster Linie im Rahmen klinischer Studien angewendet und ist im klinischen Alltag von geringer Bedeutung. Mit dem Wissen über die Konzentration von F1 + F2 lässt sich auf die im Organismus

ablaufende Thrombingenerierung schließen. Auch hier beruht das Messverfahren auf einem Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip. Die Citratplasmaprobe wird in eine Mikrotiterplatte pipettiert, die mit Antikörpern gegen das Prothrombinfragment F1 + F2 beschichtet ist. Im Laufe der Inkubationszeit kommt es zu einer Komplexbildung zwischen den Antikörpern und den F1 + F2-Antigenen. Nach dreimaligem Waschen wurden in einer zweiten Reaktion mit Peroxidase konjugierte Antikörper zugegeben, die an die freien F1 + F2-Determinanten binden. Nach gewisser Inkubationszeit wurde erneut gewaschen und die gebildeten Komplexe mit chromogenem Substrat angefärbt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure nach 30 Minuten gestoppt, woraufhin die Messung der Farbstoffentwicklung, die proportional zu dem vorhandenen F1 + F2 ist, stattfand. Das Ergebnis wurde von dem MRX-Reader in nmol/l angegeben. Auch bei der Bestimmung des Prothrombinfragments F1 + F2 wurde eine Standardkurve mit vier Konzentrationen mitgeführt.

Die Standardproben Enzygnost F 1+2(monoclonal) von DADE Behring lagen in folgenden Konzentrationen vor:

S1 = 0,04 nmol/l S2 = 0,2 nmol/l S3 = 2,0 nmol/l S4 = 10,0 nmol/l

2.2.7 Die endogene APC-Aktivierung

Mit Citrat antikoagulierte Poolplasmaproben wurden sowohl mit PPP-Reagenz (5mM), einer Mischung aus Phospholipiden und rekombinantem tissue factor zum Auslösen der Gerinnung, als auch mit einem Stoff, der die Fibrinpolymerisation hemmt, versetzt. Des Weiteren wurde dem Versuchsansatz zur verstärkten Aktivierung von Protein C 100 µg/ml Thrombomodulin beigelegt. Nach Zugabe dieser Reagenzien kam es beim Ablauf der Gerinnung zwar zur Bildung von Thrombin und Thrombin-Thrombomodulinkomplexen, die weitere Fibrinpolymerisation jedoch wurde gehemmt. Der Fibrinpolymerisations-Inhibitor (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH.AcOH) besteht aus den Aminosäuren Glycin, Prolin, Arginin und bindet mit hoher Affinität an Fibrinogen, wodurch er die Bildung von Fibrin hemmt. Die Konzentration des Fibrinpolymerisations-Inhibitors betrug final 2 mg/ml. Mit der Zugabe von 10 mM CaCl₂ wurde die Reaktion gestartet und die Gerinnungskaskade aktiviert. Daraufhin kam es zu einem Anstieg von Thrombin, das sich mit dem zuvor hinzugegebenen Thrombomodulin verbunden hat und so das endogen vorhandene Protein C aktivieren konnte. Das verwendete Thrombomodulin ist ein Oberflächenprotein auf den Endothelzellen der Lunge von Hasen und wurde vom Hersteller extrahiert. Es ist ein wesentlich stärkerer Protein C-Aktivator als humanes Thrombomodulin.

Reaktionsansatz: 2000 μ l Poolplasma
 + 100 μ l PPP (5 mM)
 + 42 μ l H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH (final: 2 mg/ml)
 + 26,6 μ l Thrombomodulin (100 μ g/ml)
 + 20 μ l CaCl₂ (10 mM)

Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von 100 μ g/ml Hirudin gestoppt. Durch die Komplexbildung mit Thrombin kam es zu einer Inaktivierung des Thrombins und damit zu keiner weiteren Aktivierung von Protein C. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Hirudin gegenüber Thrombin kam es hierbei jedoch nicht nur zu einer Inaktivierung des freien Thrombins, sondern ebenfalls zu einer Inaktivierung des bereits an Thrombomodulin gebundenen Thrombins. Die Dissoziationskonstante K_D für Hirudin gegenüber Thrombin ist mit $K_D = 0,2$ pM wesentlich kleiner als die von Thrombin gegenüber Thrombomodulin ($K_D = 5$ nM). Wegen der hohen Affinität des Hirudins gegenüber Thrombin wird das Thrombin aus dem Komplex mit TM verdrängt (*Warkentin et al., 2005*). Zusätzlich wurde Aprotinin (20 μ M) hinzugegeben. Aprotinin schützt das gebildete APC vor den im Plasma befindlichen APC-Inhibitoren und gewährleistet dadurch, dass das bisher gebildete APC nicht wieder inaktiviert wird. Die jeweilige Probenentnahme geschah zu den Zeitpunkten:

T (in Minuten): 0 , 0,5 , 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 8 , 10

Die gebildeten APC-Konzentrationen wurden mit Hilfe des unter Punkt 2.2.1 beschriebenen APC-Assays gemessen. Bei der Messung wurde eine halblogarithmische APC-Standardreihe mitgeführt.

APC-Konzentration in [ng/ml]:

31,6 10 3,16 1 0,316 0,1 0,0316 0,01 0

Um Rückschlüsse auf die Thrombinbildung ziehen zu können, wurden zusätzlich die Thrombin-Antithrombin-Komplexe TAT und die Prothrombinspaltprodukte F 1+2 bestimmt (siehe Punkt 2.2.5 und Punkt 2.2.6). Aufgrund der Vermutung, dass durch die Bildung von APC die Konzentration von Protein C abfällt, wurde diese anschließend mit Hilfe der Protein C-Antigen-Messung (siehe Punkt 2.2.3) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Wirkung von Aprotinin auf die Messung der APC-Konzentration

Bestreben dieses Versuches war es, den generellen Einfluss von Aprotinin sowie die Auswirkung unterschiedlicher Aprotininkonzentrationen auf die Messung des APC-Gehalts in Verdünnungspuffer zu untersuchen. Hierzu wurden halblogarithmische Standardreihen mit APC-Konzentrationen von 0 - 1 ng/ml erstellt.

APC in [ng/ml]: 1 0,316 0,1 0,0316 0,01 0

Um die Wirkung des Aprotinins genau quantifizieren zu können, wurden acht verschiedene Ansätze angefertigt. Die jeweiligen Aprotininkonzentrationen betragen in [ng/ml]:

20 10 5 2 1 0,5 0,2 0

Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen und anhand der Ergebnisse die Mittelwerte errechnet.

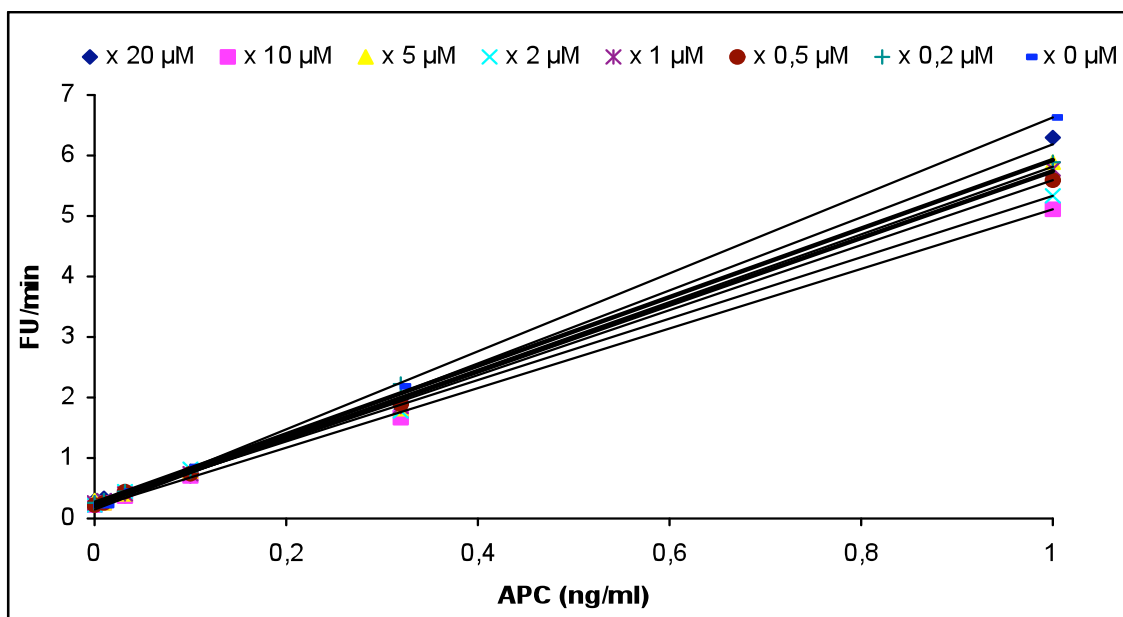


Abb. 7: Wirkung von Aprotinin auf die Messung der APC-Konzentration in Verdünnungspuffer, Darstellung von Mittelwerten

Wie mit Hilfe der Grafik verdeutlicht werden kann, wird die Messung der APC-Konzentration in Verdünnungspuffer durch die Zugabe von Aprotinin kaum beeinflusst. Die Diskrepanz zwischen dem Substratumsatz bei einer Aprotininkonzentration von 20 µM und dem ohne Zugabe von

Aprotinin ist äußerst gering. Des Weiteren wird ersichtlich, dass zwischen den Ansätzen mit hohen Aprotininkonzentrationen und denen mit niedriger Konzentration das Messverfahren nur minimale Differenzen im Umsatz des fluorogenen Substrats aufweist. Während beispielsweise bei einer APC-Konzentration von 0,316 ng/ml und einer Aprotininkonzentration von 20 μ M der Umsatz des fluorogenen Substrats bei 1,77 FU/min liegt, beträgt er bei einer Aprotininkonzentration von 0,5 μ M 1,90 FU/min. Ferner wird anhand der Grafik veranschaulicht, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der Aprotininkonzentration in Versuchspuffer und dem Umsatz des fluorogenen Substrats besteht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche unter Zugaben von 20 μ M Aprotinin durchgeführt.

3.2 Die Wirkung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen

Um gewährleisten zu können, dass das in den Proben vorhandene APC zuverlässig an die Aptamere in den wells bindet, ist die Konzentration der Aptamere von entscheidender Bedeutung. Die Voraussetzung für eine genaue Messung ist, dass die Aptamerkonzentration ausreicht, um das gesamte vorhandene APC zu erfassen. Zur Analyse der Bedeutung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen für das Testverfahren wurden Aptamere in unterschiedlichen Konzentrationen mit Verdünnungspuffer gemischt und jeweils für eine Stunde in den wells inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Mikrotiterplatte wurden APC-Standardreihen in Verdünnungspuffer einpipettiert und gemessen. Dabei wurden drei verschiedene Aptamerkonzentrationen verglichen.

2,5 pmol/100 μ l 2 pmol/100 μ l 1,5 pmol/100 μ l

Die Ergebnisse der Messung der Einzelwerte sind in Abbildung 8 dargestellt.

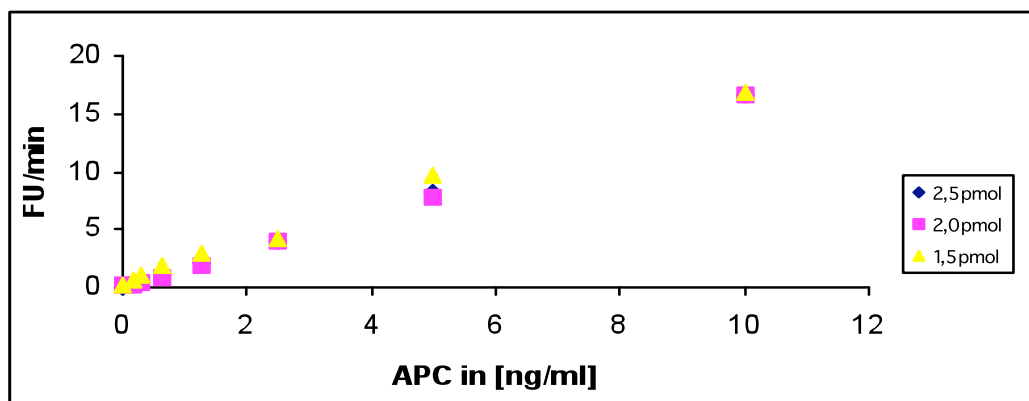


Abb. 8: Wirkung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen auf die Messung der APC-Konzentration in Verdünnungspuffer

Wie sich anhand der Versuchsergebnisse herausstellt, erbringt die Verwendung höherer Aptamerkonzentrationen bei der Messung des APC-Gehalts keinen Vorteil. In der Grafik zeigt sich, dass der Substratumsatz bei den verschiedenen Aptamerkonzentrationen nahezu identisch ist. Bestreben dieses Assays ist nicht nur eine möglichst sensitive und spezifische Arbeitsweise, sondern auch ein möglichst ökonomisches Vorgehen, sodass die weiteren Versuche mit Aptamerkonzentrationen von 1,5 pmol/100 μ l fortsetzen werden.

3.3 Die Wirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten der Aptamere

Die Auswirkung der unterschiedlichen Inkubationszeiten der Aptamere auf die Sensitivität des Messverfahrens war ein weiterer relevanter Aspekt im Rahmen der Optimierung dieses Assays. Um besagte Auswirkung ermitteln zu können, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem eine Aptamerinkubationszeit von 18 Stunden mit der von einer Stunde verglichen wurde. Hierzu wurden die wells mit Aptamerkonzentrationen von 1,5 pmol/100 μ l beschichtet und für unterschiedliche Zeit inkubiert. Es wurden lineare APC-Standardreihen in Verdünnungspuffer erstellt und diese gemäß dem weiteren Versuchsablauf gemessen.

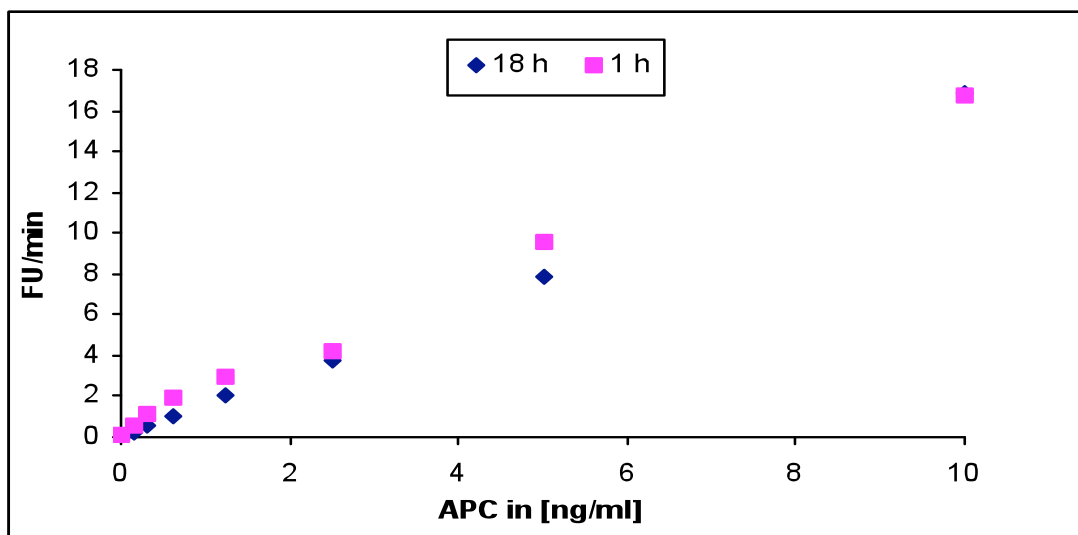


Abb. 9: Wirkung unterschiedlicher Aptamerinkubationszeiten auf die Messung der APC-Konzentration in Verdünnungspuffer, Darstellung von Einzelwerten

Dabei stellte sich heraus, dass eine Inkubation der Aptamere von 18 Stunden die gleichen Ergebnisse wie die einer Inkubation von nur einer Stunde erbrachte. Die Umsätze des flourogenen Substrats zeigten weder bei hohen APC-Konzentrationen (10 ng/ml) noch bei niedrigen (0,15 ng/ml)

signifikante Unterschiede. Um die Bestimmung der APC-Konzentrationen besonders im Hinblick auf die spätere diagnostische Anwendung in möglichst geringer Zeit durchführen zu können, wurden folgende Versuche mit Aptamerinkubationszeiten von einer Stunde fortgesetzt.

3.4 Der Vergleich von Drotrecogin alpha mit aktiviertem Captoprin

Ein weiterer wichtiger Schritt für die Entwicklung des APC-Assays war die vergleichende Messung zwischen rekombinant hergestelltem APC (Drotrecogin alpha) und humanem Protein C, das nachträglich aktiviert wurde (aktiviertes Captoprin, aCEP; siehe Punkt 2.2.4). Hauptziel war hierbei die Erbringung des Beweises, dass auch endogenes APC mit Hilfe dieses Testverfahrens gemessen werden konnte. Darüber hinaus sollte aufgezeigt werden, mit welcher Affinität die APC-Aktivität des aktivierten Captoprin im Vergleich zu Drotrecogin alpha erfasst wird. Zur Testdurchführung wurden sowohl von Drotrecogin alpha als auch von aCEP unterschiedliche Konzentrationen in Verdünnungspuffer erstellt und gemessen. Die verschiedenen Konzentrationen lagen in Doppelwerten vor. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden die sich jeweils entsprechenden APC-Konzentrationen verglichen.

Drotrecogin alpha:

APC in [ng/ml]: 1 0,5 0,25 0,125 0,0625 0,03125 0,015625 0

aCEP:

APC in [ng/ml]: 1 0,5 0,25 0,125 0,0625 0,03125 0,015625 0

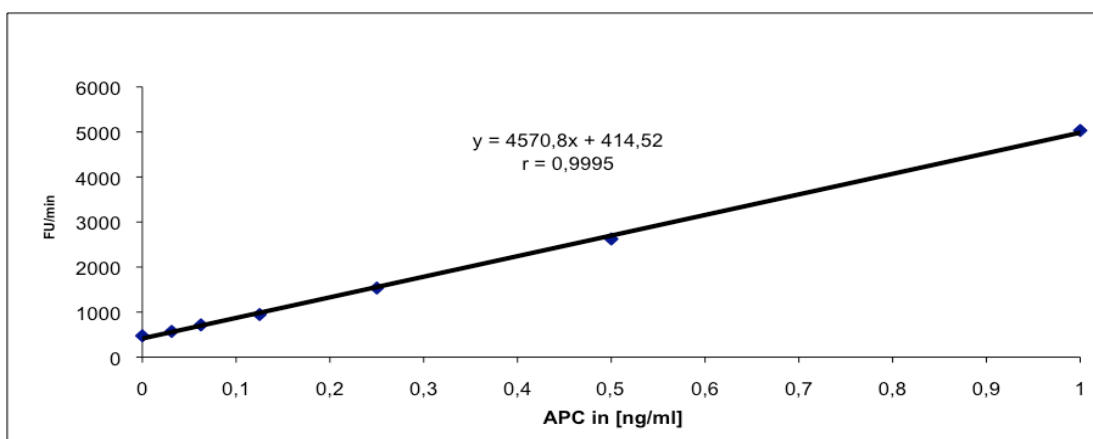


Abb. 10: Standardreihe Drotrecogin alpha in Verdünnungspuffer, Darstellung von Mittelwerten

Drotrecogin alpha	aCEP	In Prozent (%)
1	0,7994	80
0,5	0,3950	79
0,25	0,1846	74
0,125	0,0876	70
0,0625	0,0449	72
0,03125	0,0207	66
0,015625	0,0117	75
Mittelwert	/	<u>74 ± 4,92</u>

Tabelle 1: *Vergleich der APC-Aktivität von aCEP mit Drotrecogin alpha*

Wie in der Tabelle veranschaulicht, wird die APC-Aktivität von aktiviertem Captoprin im Vergleich mit Drotrecogin alpha durch die Aptamere mit im Mittel $74 \pm 4,92$ %-iger Aktivität erfasst. Das bedeutet, dass sowohl rekombinant hergestelltes APC als auch endogene APC-Konzentrationen unter Verwendung dieses Assay gemessen werden können. Auffällig hierbei ist, dass die Aktivität des endogenen APC um etwa 25% unter dem gemessenen Wertes des rekombinant hergestellten APC liegt.

3.5 Die Messung ohne Aptamerbeschichtung

Anhand dieses Versuchs sollte verdeutlicht werden, dass ohne Aptamerbeschichtung der wells keine zuverlässige Messung der APC-Konzentration möglich ist. Hierzu wurde im Rahmen der Testdurchführung eine APC-Standardreihe in gepooltem Citratplasma erstellt und diese manuell in wells pipettiert. Die wells wurden zuvor nicht mit Aptameren beschichtet, aber dennoch mit 200µl Blockpuffer geblockt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde gemäß des weiteren Versuchsablaufs fortgefahren und schließlich der Peptidsubstratumsatz durch den ELISA-Prozessor gemessen.

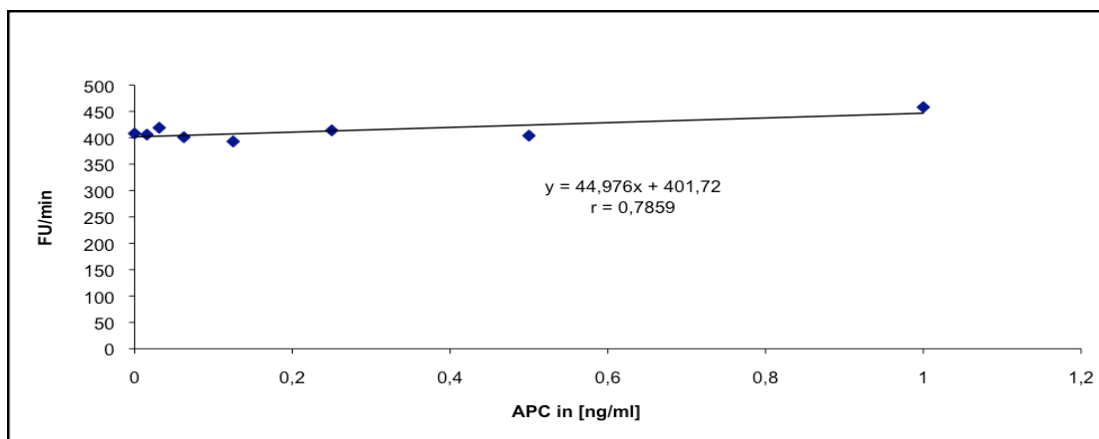


Abb. 11: Messung der APC-Konzentrationen in Citratplasma ohne Aptamerbeschichtung der wells, Darstellung von Einzelwerten

Angesichts der Grafik ist zu erkennen, dass die Umsatzrate des fluorogenen Substrats unabhängig von den gemessenen APC-Konzentrationen nahezu gleich bleibt. Bei hohen APC-Konzentrationen (1 ng/ml) ist ein geringer Anstieg zu erkennen, der möglicherweise auf unspezifisch gebundenes APC zurückzuführen ist. Ohne Aptamerbeschichtung gibt es für das APC keine Möglichkeit der zuverlässigen Bindung in den einzelnen wells. Aufgründessen wird das APC durch die sich anschließenden Waschzyklen nahezu vollständig entfernt. Essentiell für diese Testverfahren sind demnach die Aptamere, die eine Bindung des APCs in den wells zur nachfolgenden Quantifizierung erst ermöglichen.

3.6 Der Vergleich unterschiedlicher Peptidsubstrate

Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität des APC erfolgte mittels Verwendung eines synthetischen Peptidsubstrats, das durch die enzymatische Aktivität des APC gespalten wurde. Diese Substrate sind kurzkettige Peptide, die in der Regel aus drei bis fünf Aminosäuren bestehen und mit einem Indikator versehen sind. Als Indikator dient 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC). Die Auswahl und Anordnung der Aminosäuren bestimmt die Spezifität des Peptidsubstrats gegenüber seinem Zielenzym. In diesem Versuch wurden zwei verschiedene Peptidsubstrate miteinander verglichen, um deren unterschiedlichen Bindungsaffinitäten gegenüber APC charakterisieren zu können. Pefa-5791 hat laut Hersteller zwar eine schnellere Umsatzrate als Pefa-3342, weist aber möglicherweise eine geringere Spezifität auf. Im Rahmen des Aufbaus eines APC-Assays ist es für ein genaues Messverfahren jedoch unabdingbar, über ein Substrat mit einer hohe Spezifität und einer schnellen Umsatzrate verfügen zu können.

	K_m	k_{cat}
Pefa-5791	0,56 mM	62,0 s ⁻¹
Pefa-3342	0,26 mM	8,5 s ⁻¹

Es wurde eine halblogarithmische APC-Verdünnungsreihe in Verdünnungspuffer hergestellt. Die APC-Konzentrationen betragen:

in ng/ml: 1 0,316 0,1 0,0316 0,01 0

Bis zur Hinzugabe von Peptidsubstrat war der Versuchsablauf beider Ansätze identisch. Erst durch den letzten Schritt – die Zugabe von Peptidsubstrat – erhielt man unterschiedliche Versuchsansätze. Es wurde nicht nur die Art des Substrats verglichen, sondern auch unterschiedliche Verdünnungen des jeweiligen Substrats angefertigt, um die Möglichkeit zu haben, gleichzeitig zwischen einerseits dem besten Peptidsubstrat und andererseits der besten Peptidsubstratkonzentration zu unterscheiden. Die jeweiligen Verdünnungsreihen wurden in Dopplerwerten erstellt.

Verwendete Substrate und Konzentrationen:

Pefa-5791	Verdünnungspuffer	Pefa-3342	Verdünnungspuffer
	+ 1 mM CaCl ₂		+ 1 mM CaCl ₂
	+ 1 mM CaCl ₂		+ 1 mM CaCl ₂
a)	+ 200 µM Substrat	a)	+ 200 µM Substrat
b)	+ 400 µM Substrat	b)	+ 400 µM Substrat

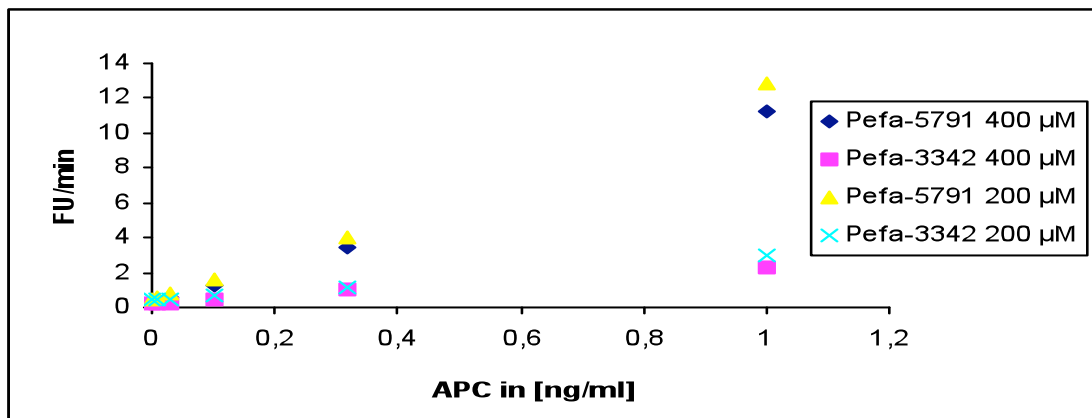


Abb. 12: Vergleich verschiedener Peptidsubstrate bei der Messung von APC in Verdünnungspuffer, Darstellung von Mittelwerten

Mit Hilfe dieses Versuchs wurde – wie auch anhand der Grafik erkennbar – verdeutlicht, dass der Substratumsatz mit dem Peptidsubstrat Pefa-5791 wesentlich höher ist als der des anderen Peptidsubstrats. Während die Konzentrationsunterschiede nur einen geringen Einfluss auf den Umsatz haben, zeigt sich zwischen den beiden Substraten ein signifikanter Unterschied der Umsatzrate: die des Pefa-3342 ist deutlich geringer. Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche mit dem Substrat Pefa-5791 durchgeführt. Da sich zwischen den Konzentrationen von 400 μM und 200 μM nur geringe Unterschiede zeigten, wurde mit einer Substratkonzentration von 200 μM fortgefahren.

3.7 Der Vergleich verschiedener Plasmaverdünnungen und Inkubationszeiten

Da die Bestimmung der APC-Konzentration in erster Linie im Plasma durchgeführt werden soll, mussten bei diesem Versuch zum einen die bestmögliche Plasmakonzentration und zum anderen die optimale Dauer der Plasmainkubationszeit herausgefunden werden. Hierzu wurden lineare Standardreihen in gepooltem Citratplasma (Poolplasma) mit APC-Konzentrationen von 0 bis 10 ng/ml erstellt. Zur Herstellung des verdünnten Poolplasmas wurde ein 1:1 Mischungsverhältnis mit Verdünnungspuffer erstellt. Durch die Zugabe von Verdünnungspuffer halbierte sich auch die Aprotinin- sowie die Hirudinkonzentration. Zur weiteren Optimierung des Tests wurde die Einwirkzeit des Plasmas in den wells variiert. Dabei wurde zwischen einer Einwirkzeit von einer und der von zwei Stunden unterschieden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte automatisch gewaschen, Substrat hinzugefügt und der Umsatz gemessen.

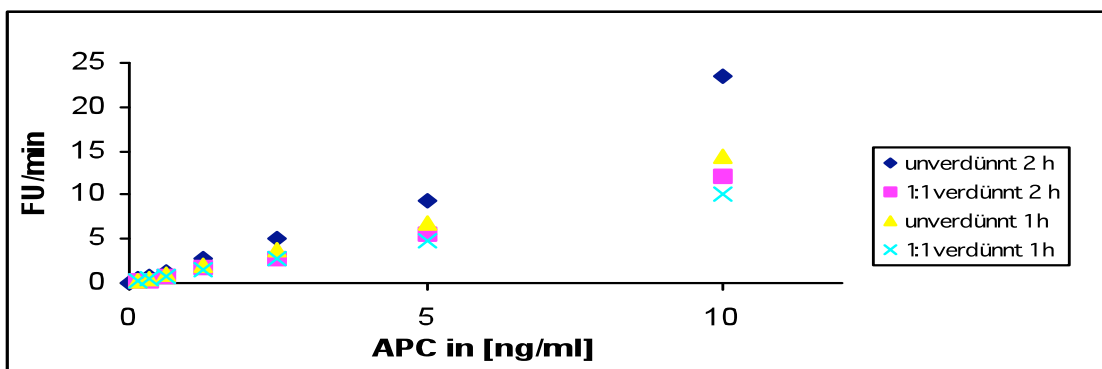


Abb. 13: Messung der APC-Konzentrationen in verdünnten und unverdünnten Poolplasmastandardreihen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, Darstellung von Einzelwerten

Anhand der Grafik ist ersichtlich, dass der Substratumsatz nach dreistündiger Messung in unverdünntem und über zwei Stunden in den wells inkubiertem Plasma am höchsten ist. Generell lässt sich feststellen, dass das Verdünnen von Plasma mit einer Minderung des Substratumsatzes einhergeht, weshalb im weiteren Verlauf darauf verzichtet wird. Da die Messung des flourogenen Substrats nach zweistündiger Inkubationszeit der einstündigen überlegen ist, werden die weiteren Versuche nach zweistündiger Inkubationszeit durchgeführt.

3.8 Die Wirkung unterschiedlicher Waschzyklen auf die Messung

Das Waschen der Mikrotiterplatte wurde durch einen automatisierten Vorgang mittels eines maschinellen washers (speziell für 96-well Mikrotiterplatten) durchgeführt. Zunächst wurde durch vorangehendes Absaugen der Mikrotiterplatte die Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurden jeweils 400µl Waschpuffer in die wells gefüllt und erneut entfernt. Diese Vorgänge können automatisch beliebig oft wiederholt werden. Je mehr Waschzyklen durchgeführt werden, desto gründlicher werden die wells gewaschen. Um die Wirkung der Anzahl der Waschzyklen auf die Messung der APC-Konzentration zu bestimmen, wurde der nachfolgende Versuch durchgeführt.

In gepooltem Citratplasma wurde durch Zugabe von Drotrecogin alpha eine APC-Konzentration von 0,01 ng/ml erstellt. Diese Proben wurden jeweils in Doppelwerten in die einzelnen wells pipettiert. Zusätzlich wurden Poolplasmaleerwerte, das heißt gepooltes Citratplasma ohne Zugabe von APC, ebenfalls in Doppelwerten verwendet. Diese Proben wurden nach zweistündiger Inkubation durch eine jeweils unterschiedliche Anzahl von Waschzyklen aus den wells entfernt. Es wurden drei, vier, fünf und sechs Waschzyklen durchgeführt. Nach Zugabe von Substrat erfolgte schließlich die Messung des flourogenen Substratumsatzes.

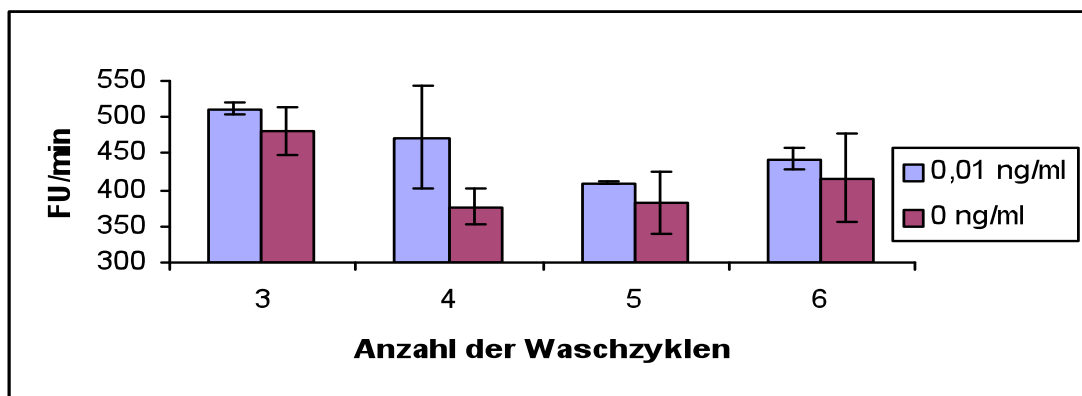


Abb. 14: Wirkung unterschiedlicher Waschzyklen auf den Substratumsatz

Es zeigte sich, dass die Anzahl der Waschzyklen durchaus einen Einfluss auf die Messung der APC-Konzentration hat. Wie aus dem Säulendiagramm hervorgeht, war der Substratumsatz nach drei Waschzyklen am höchsten, während es nach vier und fünf Waschzyklen zu einem Abfall des Umsatzes kam. Die Diskrepanz zwischen dem Leerwert und der APC-Konzentration von 0,01 ng/ml war nach vier Waschzyklen am deutlichsten. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine bestmögliche Diskriminierung geringer Konzentrationsunterschiede ermöglicht. Daraus ergab sich, dass bei den nun folgenden Versuchen nach zweistündiger Inkubationszeit vier automatische Waschzyklen durchgeführt wurden.

3.9 Die Halbwertszeit von APC in Vollblut und in Plasma

Im Rahmen dieses Versuches sollte die Halbwertszeit von APC sowohl in Vollblut als auch in Plasma bestimmt werden. Die genaue Kenntnis der Halbwertszeit ist wichtig, um die gemessenen APC-Konzentrationen richtig beurteilen und eventuelle Maßnahmen ergreifen zu können, die die Halbwertszeit beeinflussen. Zur Durchführung dieses Versuches wurde mit Hilfe von S-Monovetten (Proberöhren), die mit 0,106 molarer Citratlösung vordosiert waren, Blut abgenommen. Bei vollständiger Füllung der S-Monovetten erhielt man ein Mischverhältnis von exakt 1:10 (1 Teil Citratlösung + 9 Teile Blut). Dieses frisch abgenommene Blut wurde anschließend für 100 Minuten ruhen gelassen, um so den physiologisch vorkommenden Protein C-Inhibitoren die Inaktivierung des endogenen APC zu ermöglichen.

Es wurden vier verschiedene Ansätze erstellt, die im Versuch sowohl in Plasma als auch in Vollblut durchgeführt wurden.

- | | | |
|----|---|-----------------------------|
| 1. | Vollblut bzw. Plasma + Aprotinin + Hirudin | Lagerung auf Eis |
| 2. | Vollblut bzw. Plasma + Aprotinin + Hirudin | Lagerung bei Raumtemperatur |
| 3. | Vollblut bzw. Plasma + Hirudin ohne Aprotinin | Lagerung auf Eis |
| 3. | Vollblut bzw. Plasma + Hirudin ohne Aprotinin | Lagerung bei Raumtemperatur |

Die Konzentration von Aprotinin betrug in Vollblut 10 μM , die Hirudinkonzentration 5 $\mu\text{g/ml}$. Durch diese unterschiedlichen Versuchsansätze sollte das Verhalten der APC-Halbwertszeit unter den jeweiligen Bedingungen untersucht werden. In den Proben ohne Aprotinin kam es zu einer geringen Volumenverschiebung, die jedoch bewusst toleriert und nicht ausgeglichen wurde.

Durch das Hinzufügen bestimmter APC-Konzentrationen zu den einzelnen Proben wurde der Versuch gestartet. Zu festgelegten Zeiten (10 Minuten bis 48 Stunden) wurden Proben entnommen und bis zur Messung der APC-Konzentration bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. In die Versuchsansätze ohne Aprotinin wurde dieses hinzugefügt, um gleiche Messbedingungen zu schaffen. Nach 48 Stunden wurden alle Proben im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut, in die Mikrotiterplatten pipettiert und die APC-Konzentrationen ermittelt. Um die APC-Aktivität in den jeweiligen Versuchsansätzen quantifizieren zu können, wurde eine halblogarithmische APC-Standardreihe mitgeführt.

a) Die Halbwertszeit von APC in Vollblut

Vor Abnahme des Blutes wurden $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Hirudin in die S-Monovette und Aprotinin (final $10\text{ }\mu\text{M}$) zu den entsprechenden Ansätzen mit Aprotinin hinzugegeben. Dabei war zu berücksichtigen, dass die einzelnen Proben im Laufe des Versuches zentrifugiert wurden, worauf sich das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Substanzen änderte. Basierend auf einem zuvor labor-technisch bestimmten Hämatokrit von $0,51\text{ (l/l)}$ wurde jeweils die Hälfte der einzelnen Stoffkonzentrationen gewählt, um nach Zentrifugation des Blutes mit den anderen Ansätzen vergleichbare Ausgangskonzentrationen vorliegen zu haben. Um nach Trennung der zellulären Anteile des Blutes vom Plasma jeweils doppelt so hohe Werte zu erhalten, wurde eine Hirudinkonzentration von $5\text{ }\mu\text{g/ml}$, eine APC-Konzentration von $0,1\text{ ng/ml}$ und eine Aprotininkonzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ verwendet. Die einzelnen Proben wurden zu festgelegten Zeitpunkten entnommen, für 15 Minuten bei 9.000 U/min (7.700 g) zentrifugiert und bei -80°C eingefroren. Die Messung der APC-Konzentration erfolgte nach erneutem Auftauen der Plasmaproben im Wasserbad bei 37°C . Es wurden jeweils Einzelwerte bestimmt.

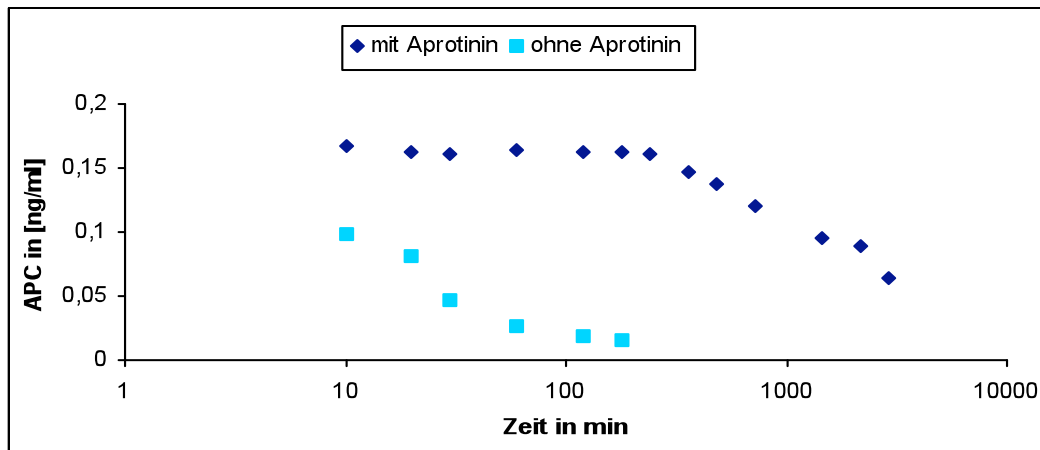


Abb. 15: Haltbarkeit von APC (0,2 ng/ml) bei Lagerung auf Eis, mit und ohne Aprotinin in Vollblut

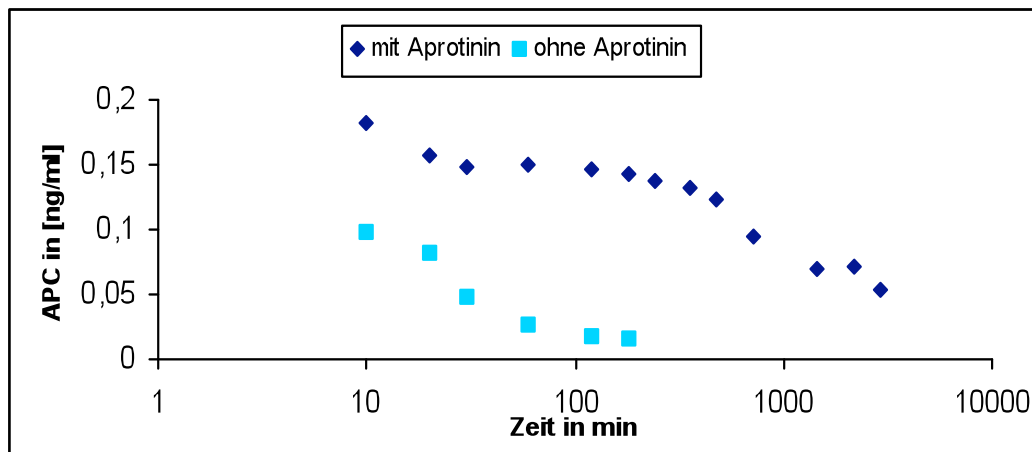


Abb.16: Haltbarkeit von APC (0,2 ng/ml) bei Lagerung bei Raumtemperatur, mit und ohne Aprotinin in Vollblut

Wie in diesen beiden Versuchsansätzen deutlich wird, weist APC unter Zugabe von Aprotinin eine Halbwertszeit von über 15 Stunden auf. Sie kann durch Lagerung der Proben auf Eis verlängert werden. Die Halbwertszeit wurde mit einer Formel errechnet ($y = y_0 e^{-xt}$ woraus folgt, $t_{1/2} = \ln 2/x$) und betrug für APC ohne Zusatz von Aprotinin gelagert auf Eis 108 Minuten und bei Raumtemperatur 39 Minuten. Die Haltbarkeit von APC ohne Zugabe von Aprotinin ist wesentlich geringer. Wie in den Versuchen mit Aprotinin zeigte sich auch hier, dass bei Raumtemperatur eine geringere Halbwertszeit des APC zu beobachten ist.

b) Die Haltbarkeit von APC in Plasma

Dieser Versuch lief ähnlich wie der vorhergehende Versuch ab, jedoch mit dem Unterschied, dass das Blut direkt nach der Blutabnahme für 15 Minuten bei 7.700 g zentrifugiert wurde. Das hierbei gewonnen Plasma wurde anschließend für 100 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen, sodass das endogene APC, wie auch beim Versuch in Vollblut, inaktiviert werden konnte. Durch Zugabe von 0,15 ng/ml APC wurde der Versuch gestartet. Die Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und eingefroren. Die Messung der APC-Aktivität erfolgte anhand von Einzelwerten nach erneutem Auftauen aller Proben im Wasserbad.

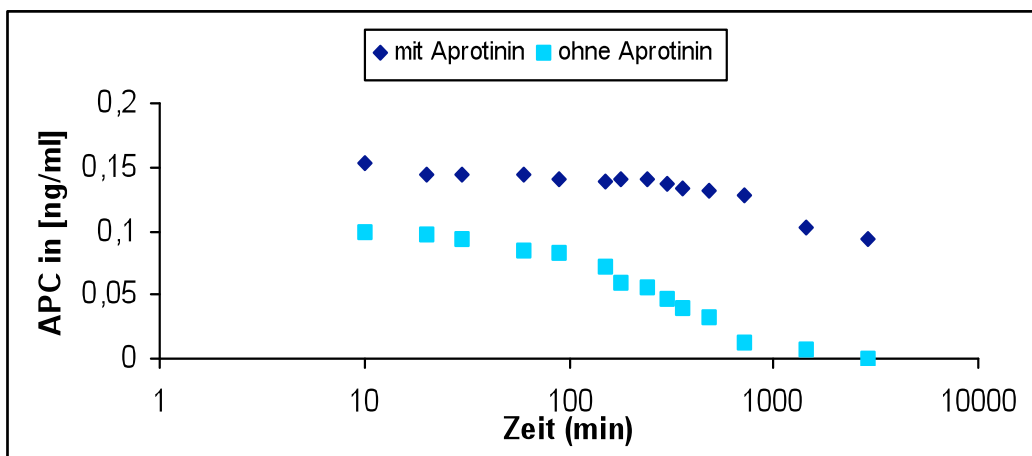


Abb. 17: Haltbarkeit von APC (0,15 ng/ml) bei Lagerung auf Eis, mit und ohne Aprotinin in Citratplasmalasma

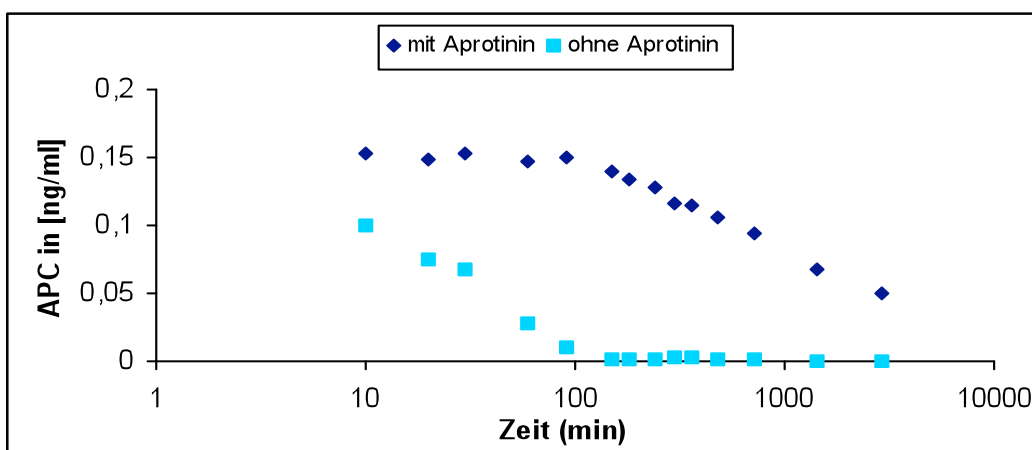


Abb.18: Haltbarkeit von APC (0,15 ng/ml) bei Lagerung bei Raumtemperatur, mit und ohne Aprotinin in Citratplasma

Die Halbwertszeit von APC in den Plasmaproben ohne Aprotinin betrug bei Lagerung auf Eis 46 Minuten und bei Raumtemperatur 25 Minuten. Ähnlich wie im Versuch mit Vollblut verlängert sich die Haltbarkeit von APC unter Anwesenheit von Aprotinin enorm. Die APC-Konzentration bleibt bei Raumtemperatur über 150 Minuten nahezu konstant. Ein Abfall des APC ließ sich erst nach etwa 150-200 Minuten feststellen, wohingegen in den auf Eis gelagerten Proben nur ein geringer Abfall der APC-Konzentration festzustellen ist.

Wie bei den Versuchen in Vollblut zeigte sich auch bei diesem Versuch, dass durch Lagerung der Proben auf Eis die Halbwertszeit von APC signifikant verlängert werden kann.

3.10 Der Einfluss von Protein C auf die Messung von APC

Bestreben war es, mit Hilfe dieses Versuches Erkenntnisse über den Einfluss von Protein C auf die Messung der APC-Plasmakonzentration zu erlangen. Es stellte sich die Frage, ob sich die Aptamere, die sehr spezifisch aktiviertes Protein C binden, durch hohe Protein C-Konzentrationen im Plasma beeinträchtigen lassen. Zur Durchführung der Messung wurde kommerziell erworbenes Protein C-Mangelplasma verwendet. Dieses Mangelplasma enthält so gut wie kein Protein C und wird aus humanem Citratplasma mit immobilisierten Antikörpern gegen Protein C hergestellt, die dem Plasma das Protein C entziehen. Es wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Protein C-Konzentrationen erstellt, wobei Ceprotin als Protein C-Quelle diente. Sechs verschiedene Ansätze wurden hergestellt.

Ansatz:	1	2	3	4	5	6
Protein C:	∅	1 U/ml	2 U/ml	4 U/ml	6 U/ml	8 U/ml

Eine Unit (U) entspricht der Menge Protein C in einem Milliliter Plasma.

Diesen Ansätzen wurde Hirudin (10 µg/ml) und Aprotinin (20µM) beigelegt. Anschließend wurden in jeden Ansatz bestimmte APC-Konzentrationen pipettiert (0,5 ng/ml bzw. 0,05 ng/ml).

Gemäß des weiteren Versuchsablaufs wurde die APC-Konzentration in Doppelwerten ermittelt.

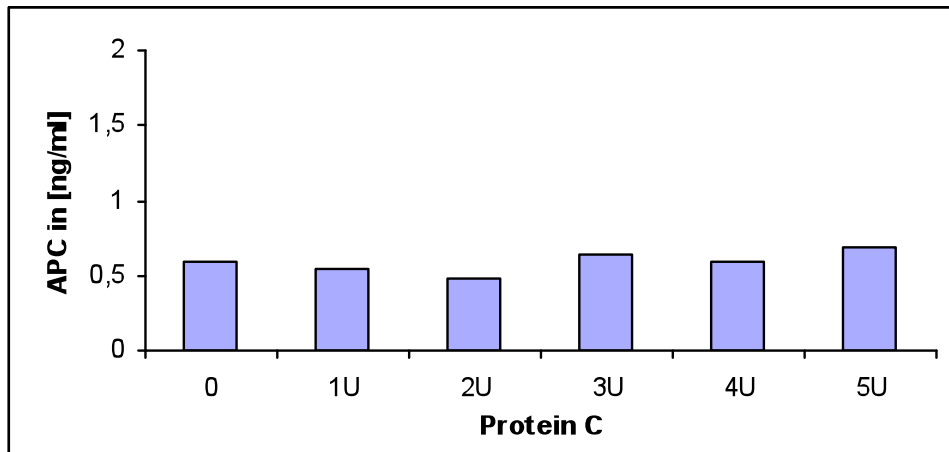


Abb. 19: Einfluss von Protein C auf die Messung von APC (0,5 ng/ml)

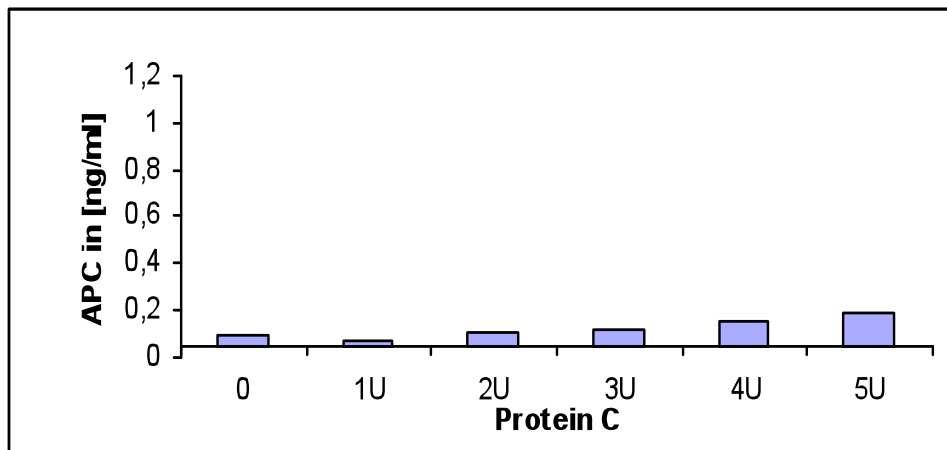


Abb. 20: Einfluss von Protein C auf die Messung von APC (0,05 ng/ml)

Wie anhand beider Säulendiagramme zu erkennen ist, besteht durchaus ein Einfluss von Protein C auf die Messung der APC-Konzentration. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zwischen APC und Protein C wurde die Hypothese aufgestellt, dass es aufgrund eines enormen quantitativen Überschusses an Protein C im Plasma auch zu einer Bindung zwischen Protein C und den Aptameren kommt. Die Folge hiervon ist, dass weniger Bindungsstellen für APC zur Verfügung stehen. Da das Peptidsubstrat aber nur von APC umgesetzt werden kann, würde es zu einem Abfall des Substratumsatzes kommen, was wiederum die Abnahme der gemessenen APC-Konzentrationen nach sich ziehen würde. Wie das Ergebnis dieses Versuches zeigt, ist jedoch der gegenteilige Fall eingetreten: Die gemessenen APC-Konzentrationen sind mit Zunahme von Protein C im Plasma ebenfalls angestiegen.

3.11 Die Berechnung der Reproduzierbarkeit in Citratplasma

Um gewährleisten zu können, dass die gemessenen APC-Werte reproduzierbar sind, wurden bestimmte APC-Konzentrationen auf ihre Intra- und Inter-Assay-Variabilität überprüft. Zu diesem Zweck wurden durch Zugabe von Drotrecogin alpha in gepooltes Citratplasma bestimmte APC-Konzentrationen hergestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Diese Testansätze wurden in Dreifachwerten sowohl in einer Messung als auch in drei voneinander getrennten Messserien an verschiedenen Tagen eingesetzt, wobei ihre APC-Konzentration gemessen wurde. Die jeweils berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sind in Tabelle 2 dargestellt.

APC in [ng/ml]	Intra-Assay			Inter-Assay		
	X (n = 3)	S	VK (%)	X (n = 3)	S	VK (%)
2,0	1,8956	0,0691	3,6433	1,9221	0,1800	9,3655
1,0	0,9177	0,0102	1,1091	0,9143	0,0599	6,5545
0,5	0,4855	0,0173	3,5687	0,4579	0,0273	5,9558
0,1	0,1625	0,0157	9,6878	0,1116	0,0085	7,6288
0,05	0,0488	0,0073	14,9857	0,0402	0,0046	11,3487
0,02	0,0148	0,0020	13,3054	0,0184	0,0019	10,2030

Tabelle 2: Darstellung der Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten des flourogenen Testsystems bei Vorliegen unterschiedlicher APC-Konzentrationen; Anzahl der Messungen (n), Mittelwert (x), Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (VK)

Wie in der Tabelle zu sehen ist, liegen die Variationskoeffizienten sowohl in der Bestimmung der Intra- als auch in der der Inter-Assay-Variabilitäten bei APC-Werten von 0,05 ng/ml und 0,02 ng/ml zwischen 10 % und 14 %. Damit sind sie etwas größer als bei der Bestimmung von höheren APC-Konzentrationen. Bei APC-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 2 ng/ml konnten Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten zwischen 1 % und 9 % errechnet werden. Generell fällt auf, dass sich die Messungen der APC-Konzentrationen zuverlässig reproduzieren lassen und nur eine geringe Abweichung untereinander aufweisen.

3.12 Die Leerwert-Problematik

Wie sich im Verlauf der Versuchsreihe herausstellte, war die Unterscheidung zwischen den niedrigen APC-Konzentrationen im Poolplasma und den Leerwerten schwierig. Im Poolplasma, das bei -40°C gelagert wird, scheint immer noch ein geringer Grundgehalt von APC vorhanden zu sein. Da die sich im Plasma befindenden Proteaseinhibitoren wie der Protein C-Inhibitor (PCI), α_1 -Antitrypsin ($\alpha_1\text{AT}$), α_2 -Anitplasmin ($\alpha_2\text{AP}$) und α_2 -Makroglobulin ($\alpha_2\text{M}$) das APC inaktivieren, nimmt die APC-Konzentration bei Lagerung in-vitro ab. Um feststellen zu können, wie sich dieser Grundgehalt an APC auf das Testverfahren auswirkt, war ein Vergleich von mehreren Poolplasmaproben mit Protein C-Mangelplasma (PC-MP) nötig. Des Weiteren wurde der Substratumsatz von Verdünnungspufferleerwerten und APC-Konzentrationen von 0,05 ng/ml in Verdünnungspuffer (APC-VP) gemessen. Diese Messergebnisse wurden untereinander verglichen, um eine Aussage über die jeweiligen Substratumsätze beziehungsweise APC-Konzentrationen treffen zu können. Zur Quantifizierung der APC-Konzentrationen wurde eine halblogarithmische Standardreihe in Verdünnungspuffer erstellt und jeweils in Doppelwerten gemessen.

Gemessene APC-Konzentrationen in ng/ml:

<i>Poolplasma</i>	<i>PC-Mangelplasma</i>	<i>Verdünnungspuffer</i>	<i>APC-VP</i>
0,0477	0,0413	0,0299	0,0944
0,0511	0,0435	0,0165	0,0871
0,0510	0,0413	0,0262	0,0935
0,0541		0,0246	0,0988
0,0492		0,0211	
0,0571		0,0258	
0,0516 ± 0,0034	0,0420 ± 0,0046	0,0240 ± 0,0013	0,0934 ± 0,0048

Ergebnisse nach Wiederholen des gleichen Versuches:

0,0458 ± 0,0082	0,0284 ± 0,0042	0,0175 ± 0,0014	0,0822 ± 0,0025
------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Tabelle 3: Bestimmung der APC-Konzentrationen in Poolplasma, Protein C-Mangelplasma, Verdünnungspuffer sowie Verdünnungspuffer mit APC (0,05 ng/ml); Mittelwerte fett gedruckt, alle gemessenen APC-Konzentrationen in ng/ml

Wie sich anhand der Messungen herausstellte, waren die APC-Konzentrationen im Poolplasma deutlich höher als im Protein C-Mangelplasma. Während die Konzentration von APC in Ersterem im Mittel bei 0,049 ng/ml lag, betrug sie in Letzterem 0,035 ng/ml. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass sich der Verdünnungspufferleerwert gut von den Plasmaproben zu unterscheiden war, obwohl sich ein gewisser Substratumsatz im Verdünnungspuffer messen ließ. Die erstellten APC-Konzentrationen im Verdünnungspuffer waren durchweg höher als die APC-Konzentrationen in den Poolplasmaproben.

3.13 Der Vergleich von Citrat- mit Hirudinplasma

Die bisherigen Versuche wurden weitgehend in gepooltem Citratplasma durchgeführt. Im Versuchsverlauf stellte sich jedoch heraus, dass bei den Messungen vereinzelte Werte durch überschießenden Substratumsatz gekennzeichnet waren. Um die Ursache des Hintergrundrauschens ermitteln, es eliminieren und damit den Grundumsatz des fluorogenen Substrats reduzieren zu können, wurde eine vergleichende Messung der APC-Konzentration zwischen Poolplasma und Hirudinplasma durchgeführt. Das Hirudinplasma wurde mittels Zentrifugation von zuvor abgenommenem Blut gewonnen, welches direkt nach der Abnahme mit 10 µg/ml Hirudin versetzt wurde. Beiden Plasmansätzen wurde zusätzlich Aprotinin (20 µM) hinzugefügt. Gemessen wurden sechs Werte sowohl in Citrat- als auch in Hirudinplasma.

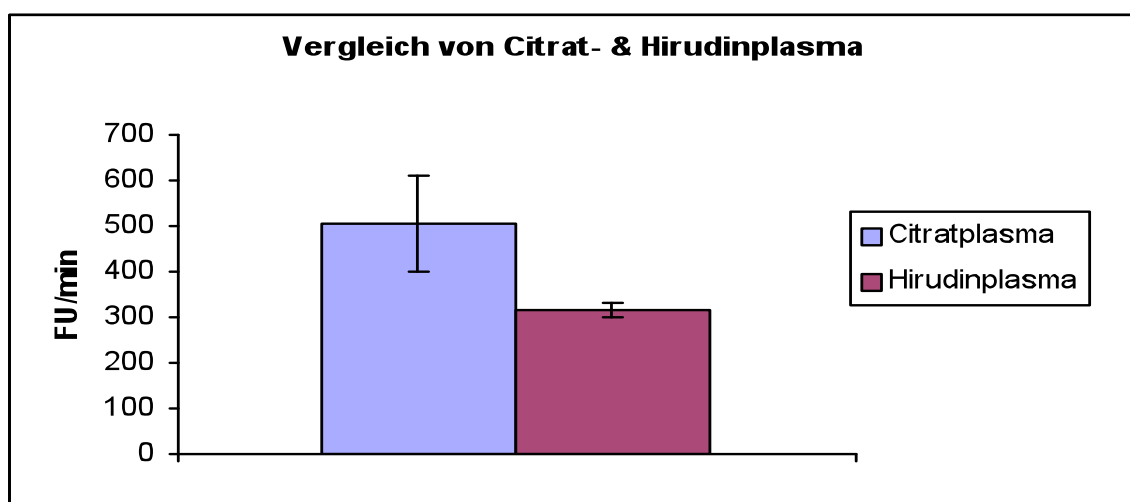


Abb. 21: Vergleichende Messung von Citrat- und Hirudinplasma

Anhand der Grafik, die den Substratumsatz in Citrat- und Hirudinplasma vergleicht, zeigt sich, dass sowohl der Umsatz an chromogenem Substrat als auch die Standardabweichung im Citratplasma wesentlich höher ist, was darauf hinweist, dass die einzelnen gemessenen Werte stärker vom Mittelwert abweichen, als dies im Hirudinplasma der Fall ist. Demzufolge kann eine genauere Bestimmung der APC-Plasmakonzentration im Hirudinplasma vorgenommen werden.

3.14 Leerwert in Citratplasma, Hirudinplasma und Citrat- + Hirudinplasma

In diesem Versuch wurden drei verschiedene Ansätze miteinander verglichen: Hirudinplasma, Citratplasma und schließlich Citratplasma mit Zugabe von 20 µg/ml Hirudin. Zum einen wurden die Leerwerte der verschiedenen Ansätze gemessen, zum anderen jeweils eine APC-Konzentration von 0,032 ng/ml erstellt und anschließend die jeweilige Umsatzrate des flourogenen Substrats ermittelt. Die Messwerte jedes Ansatzes lagen in Dreifachwerten vor.

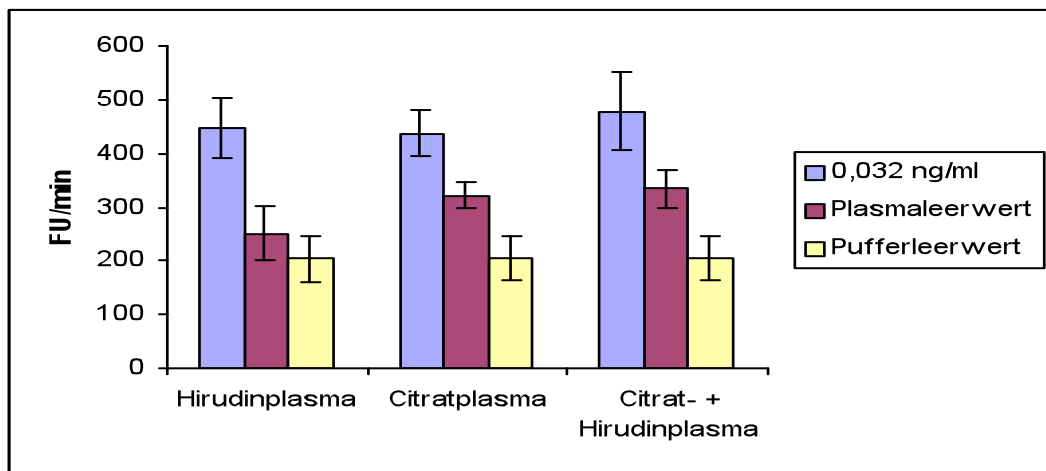


Abb. 22: Vergleichende Messung der Leerwerte, sowie APC-Konzentrationen von 0,032 ng/ml, in Citrat-, Hirudin- und Citrat- & Hirudinplasma

Anhand des gemessenen Substratumsatzes lässt sich feststellen, dass bei einer APC-Konzentration von 0,032 ng/ml in allen drei Ansätzen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Bei der Messung der Leerwerte hingegen ergaben sich unterschiedliche Substratumsätze. Während sowohl im Citratplasma als auch im Citrat- + Hirudinplasma die Plasmaleerwerte relativ hoch waren, ergab die Messung im Hirudinplasma einen Plasmaleerwert, der nur knapp über dem Pufferleerwert lag.

Basierend auf diesen Versuchsergebnissen und auf dem unter Punkt 3.14 genannten Ergebnis lässt sich die Vermutung anstellen, dass das Citrat an den erhöhten Grundumsätzen beteiligt ist.

3.15 Der Einfluss von DNAsen

Um eine Analyse der Wirkung von DNAsen auf die Bestimmung der APC-Plasmakonzentration liefern zu können, wurde der im Folgenden beschriebene Versuch durchgeführt.

DNAsen sind Nukleasen, die Nukleinsäuren an ihrer 3'-5'-Phosphodiesterbindung hydrolysieren und somit spalten (siehe Punkt 1.2.3.2). Aufgrund der Abwesenheit von Ca^{2+} verringert sich die Aktivität der Nukleasen und somit möglicherweise auch die durch sie verursachte Beschädigung der Aptamere (*Chen et al., 2002*). Um die Wirkung der Nukleasen und deren Einfluss auf die Messung der APC-Konzentration bestimmen zu können, wurden drei verschiedene Versuchsansätze mit Citratplasma (20mM), EDTA-Plasma und Hirudinplasma (final 10 $\mu\text{g/ml}$ Hirudin im Plasma) angesetzt. Zur Gewinnung von EDTA-Plasma wurden kommerzielle Probieröhren von Sarstedt verwendet. EDTA diente als Antikoagulans und wurde in einer Konzentration von 1,2 – 2 mg EDTA/ml Blut in den S-Monovetten vorgelegt. Seine gerinnungshemmende Wirkung beruht, wie bei Citrat auch, auf der Komplexbildung mit Ca^{2+} . Die theoretische Überlegung hinter diesen Ansätzen ist, dass im Hirudinplasma Ca^{2+} frei vorliegt, wodurch die DNAsen aktiver sind und die Aptamere angegriffen werden können. Mit Zunahme der Inkubationszeit des Plasmas in den mit Aptameren beschichteten wells müsste auch die Beschädigung der Aptamere zunehmen, dadurch die Bindung von APC beeinträchtigt werden und folglich die gemessene APC-Konzentration sinken. Da im Citratplasma und im EDTA-Plasma Ca^{2+} komplexiert ist, müsste der Schaden der Aptamere geringer ausfallen.

Die verschiedenen Plasmen wurden für 10 bis 120 Minuten in den wells inkubiert. Beendet wurde die jeweilige Inkubationszeit durch Entnahme des Plasmas mittels Pipette und Einfüllen von mit 10 mM Ca^{2+} versetztem Verdünnungspuffer. Anschließend wurde in die einzelnen wells mit APC versehener Verdünnungspuffer gefüllt, der Substratumsatz gemessen und die APC-Konzentration bestimmt. Es wurden zwei verschiedene APC-Konzentrationen eingesetzt, 1ng/ml und 5 ng/ml. Zusätzlich wurde im Verdünnungspuffer eine halblogarithmische Standardverdünnungsreihe mit bestimmten APC-Konzentrationen erstellt, mit deren Hilfe – basierend auf den jeweiligen Substratumsätzen – die APC-Konzentrationen in den einzelnen Medien errechnet werden konnten.

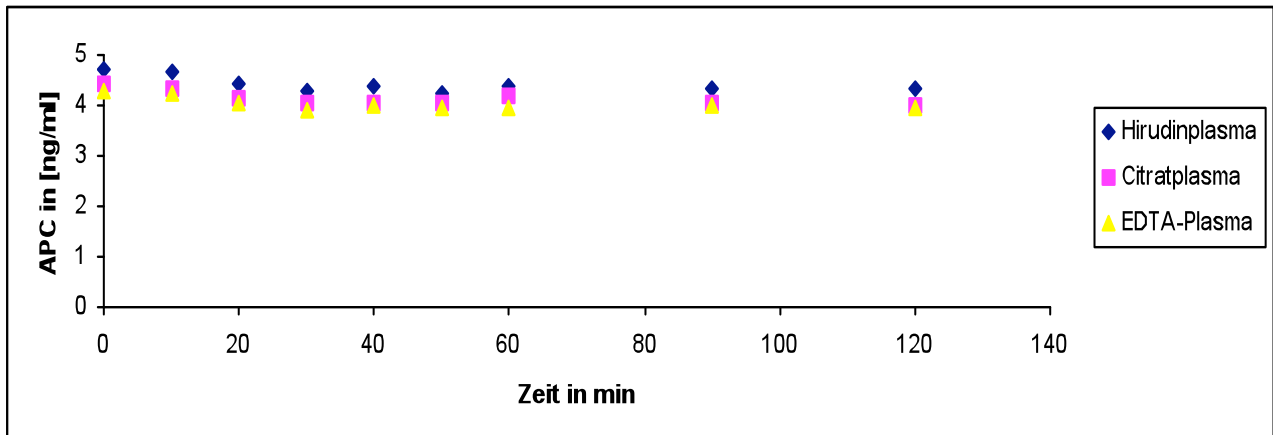


Abb. 23: Einfluss von DNAsen auf die Messung der APC-Konzentration bei 5 ng/ml

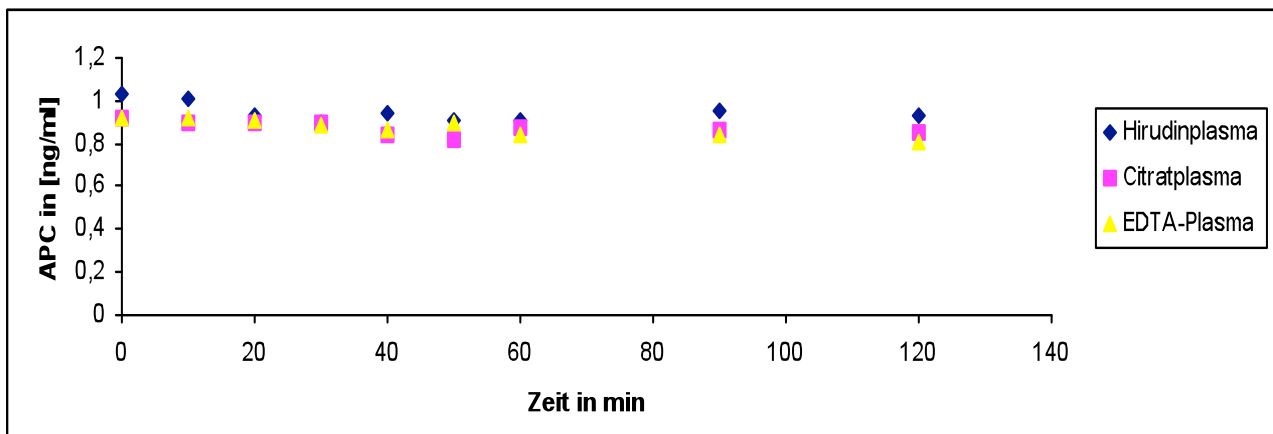


Abb. 24: Einfluss von DNAsen auf die Messung der APC-Konzentration bei 1 ng/ml

Das Ergebnis der Messung zeigt, dass in einem Zeitraum von 120 Minuten weder die ermittelten APC-Konzentrationen in Hirudin- noch in Citrat- bzw. EDTA-Plasma abfallen. Die APC-Konzentrationen bleiben die gesamte Zeit über konstant, sodass geschlussfolgert werden kann, dass der Einfluss der DNAsen auf die Aptamere im Rahmen dieses Assays verschwindend gering ist.

3.16 Die endogene APC-Generierung

Ziel dieses Versuchs war es, durch Zugabe prokoagulatorischer Substanzen die Gerinnungskaskade im Citratplasma zu aktivieren, auf diese Weise die Bildung von APC zu fördern und schließlich den Anstieg der APC-Konzentration unter Verwendung des entwickelten Testverfahrens zu quantifizieren. Um nachweisen zu können, dass Gerinnungsvorgänge im Plasma stattgefunden haben, wurden zusätzlich Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) und die Prothrom-

binfragmente F 1+2 bestimmt. Zudem wurde mit Hilfe der Protein C-Antigen-Messung in den einzelnen Plasmaproben die Protein C-Konzentration ermittelt.

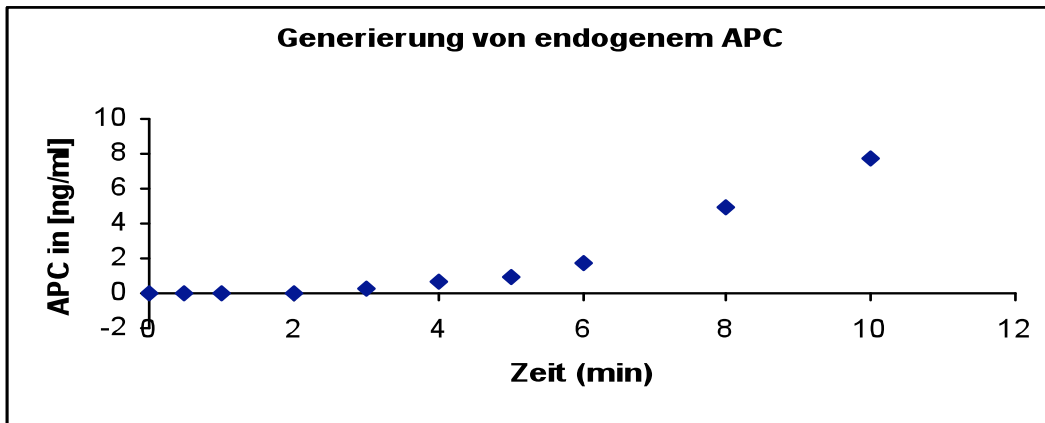


Abb. 25: *Generierung von endogenem APC über 10 Minuten*

Wie aus der Grafik hervorgeht, waren Generierung und Quantifizierung von endogenem APC erfolgreich. Durch Bildung von Thrombin-Thrombomodulin-Komplexen kam es im Verlauf der Gerinnungskaskade zu einer Aktivierung von Protein C. Innerhalb von 10 Minuten konnte ein Anstieg der APC-Konzentration um mehr als das hundertfache von 0,06 ng/ml auf 7,75 ng/ml registriert werden.

Als Beweis der tatsächlich stattgefundenen Gerinnung wurden die im Rahmen des Gerinnungsprozesses entstandenen Thrombin-Antithrombin-Komplexe und Prothrombinfragmente ermittelt.

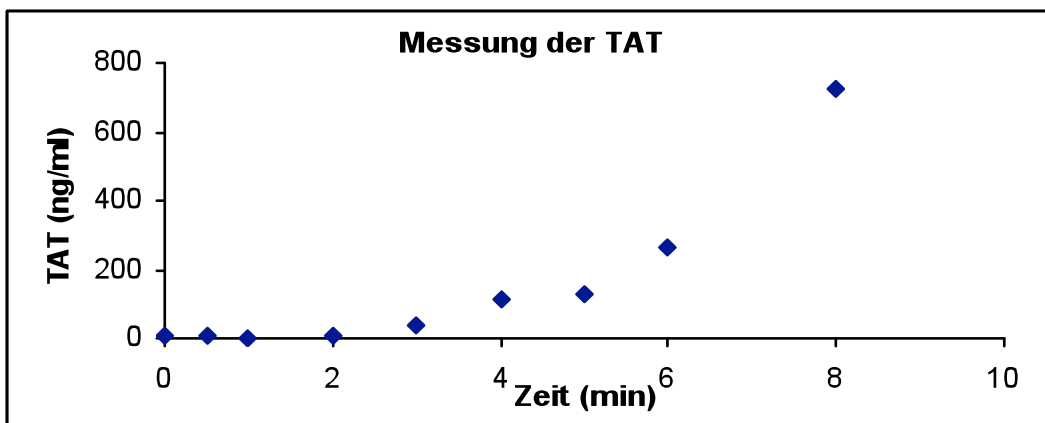


Abb. 26: *Messung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe*

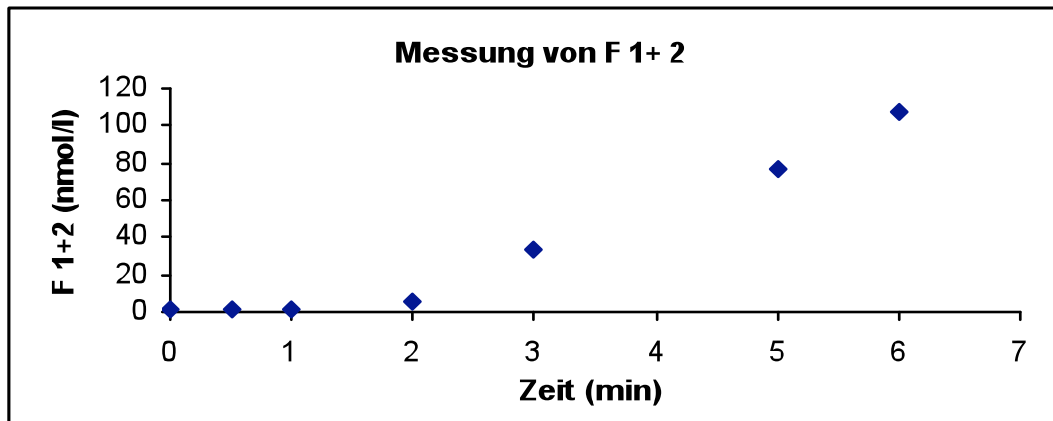


Abb. 27: Messung der Prothrombinfragmente F 1+2

Innerhalb von zehn Minuten kam es zu einem massiven Anstieg der Thrombin-Antithrombin-Komplexe und auch der Prothrombinfragmente, was beweist, dass die Gerinnung durch Zugabe von CaCl_2 und PPP-Reagenz effektiv in Gang gebracht werden konnte.

Einhergehend mit der Zunahme von APC müsste es zu einer Abnahme von Protein C kommen. Um diese Vermutung überprüfen zu können, erfolgte über die Hydrolyserate eines synthetischen chromogenen Substrats die Quantifizierung der Protein C-Konzentration.

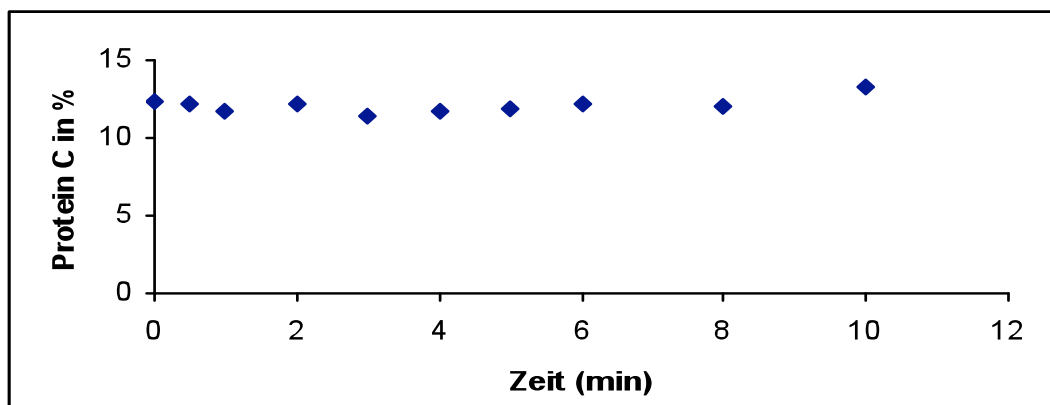


Abb. 28: Messung der Protein C-Konzentration mittels spezifische Antikörper

Die Abbildung zeigt, dass eine Abnahme der Protein C-Konzentration aus dem Ergebnis der Messung nicht ersichtlich ist. Über die gesamten 10 Minuten hinweg blieb der Gehalt an Protein C nahezu konstant.

3.17 Ausreißer in Citratplasma und Hirudinplasma

Um das Verhältnis zwischen dem Substratumsatz bei einer APC-Konzentration von 0,032 ng/ml und den Plasmaleerwerten ermitteln sowie diesen Unterschied quantifizieren zu können, wurde eine Messung von Leerwerten und APC-Konzentrationen von 0,032 ng/ml sowohl in Hirudinplasma als auch in Citratplasma durchgeführt. Hierbei lag das Augenmerk auf Anzahl und Größe der Ausreißer, die in den jeweiligen Plasmaproben auftraten.

Citratplasma		Hirudinplasma	
\emptyset APC	0,032 ng/ml APC	\emptyset APC	0,032 ng/ml APC
216	1964	201	1185
227	296	3480	311
206	288	223	382
1898	2928	297	341
286		221	
212		235	
646		4060	
465		549	
520 ± 579	1294 ± 1188	1158 ± 1623	555 ± 421

Tabelle 4: Messung des Substratumsatz (FU/min) von Citrat- & Hirudinplasma mit und ohne Zusatz von APC; Mittelwerte fettgedruckt

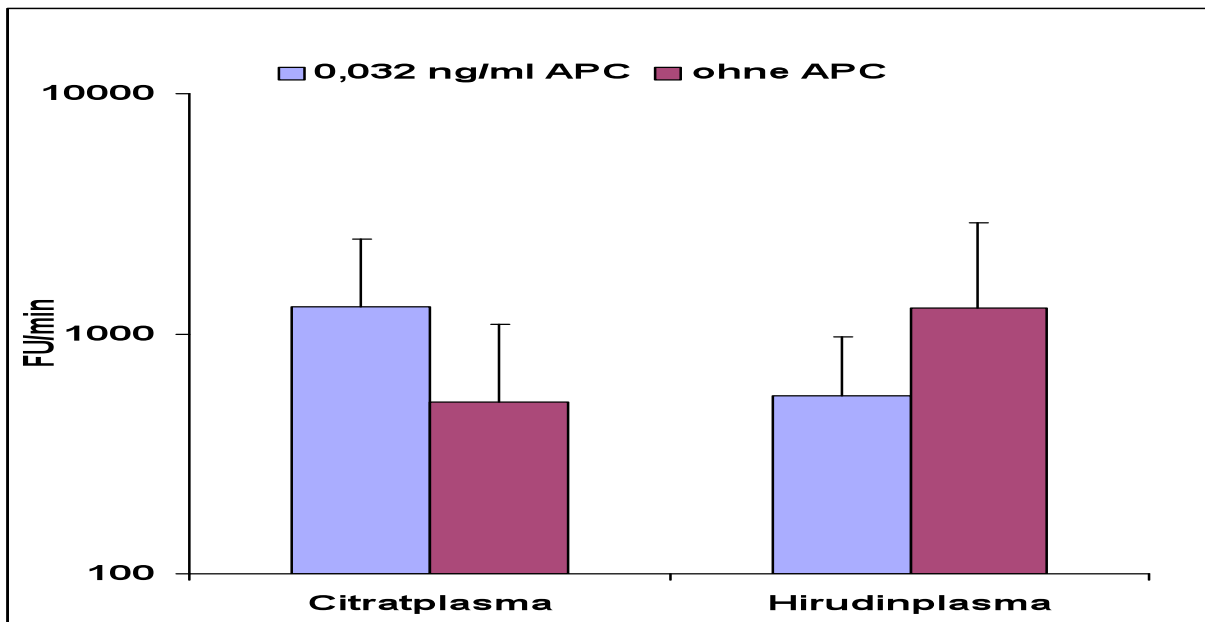


Abb. 29: Messung des Substratumsatz in Citratplasma sowie in Hirudinplasma bei Plasmaproben ohne Zugabe von APC sowie bei APC-Konzentrationen von 0,032 ng/ml

Wie die Ergebnisse der Messung veranschaulichen, kommt es sowohl im Citrat- als auch im Hirudinplasma in einzelnen wells zu überschüssigen Substratumsätzen. Zudem ist auffällig, dass die ermittelte APC-Konzentration des Leerwerts im Hirudinplasma über der des Plasmas liegt, das zuvor mit 0,032 ng/ml APC versetzt wurde. Die Zahlenwerte der Ausreißer stehen in keiner ersichtlichen Relation zu den anderen gemessenen Werten, führen aber zu einer falschen Bestimmung der Mittelwerte.

3.18 Der Einfluss von Proteaseinhibitoren

Um zu überprüfen, ob sich die vereinzelt auftretenden, überschießenden Substratumsätze mit Hilfe von Proteaseinhibitoren unterdrücken lassen, wurde eine Mikrotiterplatte komplett mit Hirudinplasmaleerwerten belegt und anschließend der Substratumsatz in den einzelnen wells gemessen. Spezielles Augenmerk lag dabei auf dem Effekt von Pefablock auf das Testverfahren. Das Plasma wurde zuvor mit 20 µg/ml Hirudin sowie 20 µM Aprotinin versetzt. Nach der ersten dreistündigen Messung wurde die Mikrotiterplatte gewaschen und erneut mit flourogenem Substrat versetzt, um die Messung daraufhin wiederholen und überprüfen zu können, ob es in denselben wells zum wiederholten Male zu einem überschüssigen Substratumsatz kam. Im Anschluss

an diese Messung wurde ein erneuter Waschzyklus der Mikrotiterplatte durchgeführt und daraufhin in jedes well 100 µl Pefablock (10 mM in Trispuffer, pH = 7,6) pipettiert.

Pefablock ist ein irreversibler Breitband-Inhibitor für Serinproteasen, der die enzymatische Aktivität von APC unterbinden und damit den Umsatz des Substrates drastisch reduzieren soll. Nach 30-minütiger Inkubation des Proteaseinhibitors erfolgte ein weiterer Waschzyklus der Mikrotiterplatte, woraufhin die wells zum wiederholten Mal mit Substrat versetzt wurden. In der letzten dreistündigen Messung wurde der Substratumsatz unter Einfluss eines Protease-Inhibitors gemessen.

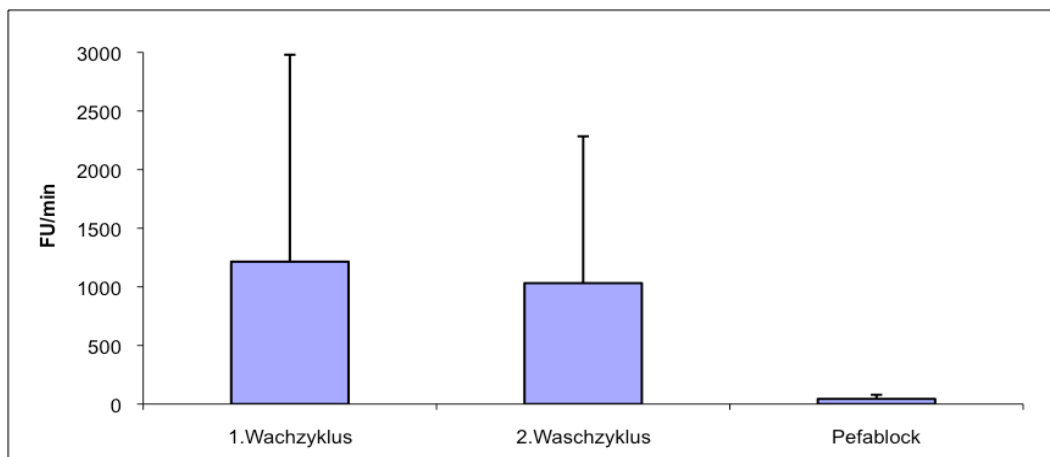


Abb. 30: Messung des Substratumsatz, Überprüfung auf Ausreißer, deren Reproduzierbarkeit sowie die Möglichkeit der Blockierung mittels Protease-Inhibitor Pefablock

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	528	511	1325	7995	354	431	376	345	475	1019
B	599	8532	525	35295	1276	416	878	319	416	10285
C	544	390	139	471	2927	432	30516	308	381	386
D	4015	607	1406	453	400	299	516	390	445	520
E	307	371	535	340	365	1098	345	133	653	678
F	410	658	536	839	4091	224	366	326	8051	1367
G	1120	405	525	1402	500	570	7109	473	1015	2220
H	1199	438	468	370	1578	993	437	1732	2877	10783

Tabelle 5: Erste Messung der APC-Konzentration in Citratplasma; Ausreißer rot markiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	578	561	1045	3805	563	578	569	520	596	914
B	560	2690	527	1171	801	654	738	589	583	3281
C	592	552	610	461	1340	530	9750	478	787	505
D	1492	596	818	600	547	547	621	749	900	689
E	487	598	600	587	569	698	825	656	747	1121
F	587	892	603	680	1503	649	569	589	4669	936
G	720	612	610	827	585	747	2447	627	1140	1209
H	918	585	636	540	809	680	585	1029	1600	3485

Tabelle 6: Zweite Messung der APC-Konzentration in Citratplasma; Ausreißer rot markiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	87	77	14	125	6	62	25	42	54	20
B	99	41	44	48	30	155	6	37	54	21
C	51	79	1213	84	70	69	43	9	43	5
D	1	17	19	24	11	60	5	62	25	8
E	30	15	13	21	23	38	15	16	0	10
F	12	53	86	16	37	13	38	26	21	91
G	29	20	7	50	14	72	88	14	67	18
H	69	46	46	72	106	64	129	65	125	104

Tabelle 7: Messung der APC-Konzentration in Citratplasma nach vorangehender Beschichtung der wells mit Pefabloc; Ausreißer rot markiert

Die in den einzelnen wells auftretenden Effekte lassen sich auch durch erneutes Waschen nicht eliminieren und sind reproduzierbar. Insgesamt weist die zweite Messung zwar eine geringere Signalstärke auf, doch kommt es in denselben wells wie in der ersten Messung zu überschießenden Substratumsätzen. Mit der Zugabe des Protease-Inhibitors lässt sich der Substratumsatz effektiv blockieren, sodass auf der gesamten Mikrotiterplatte – bis auf eine einzige Ausnahme – keine Ausreißer mehr zu beobachten sind.

3.19 Maßnahmen gegen Ausreißer

a) Der Einfluss von Hirudin im Substratpuffer

Um eine möglichst exakte Messung der APC-Konzentrationen im Plasma zu ermöglichen und die Anzahl der Ausreißer minimieren zu können, musste die Ursache für den überschießenden Substratumsatz ausfindig gemacht und eliminiert werden. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, mit dem der Einfluss von Hirudin im Substratpuffer ermittelt wurde. Die Messung fand sowohl mit Hirudinplasma als auch mit Verdünnungspuffer statt. Das Hirudinplasma wurde durch Blutabnahme gewonnen, wobei die Blutabnahmeröhrchen zuvor mit 10 µg/ml Hirudin und 10 µM Aprotinin versetzt wurden. Das weitere Vorgehen entsprach dem allgemeinen Versuchsablauf. Es wurden zwei unterschiedliche Substratpuffer (mit und ohne Hirudin) eingesetzt. In den Ansatz mit Hirudin wurde eine Hirudinkonzentration von 10 µg/ml pipettiert. Beide Substratpuffer wurden sowohl bei der Messung der APC-Konzentration des Hirudinplasmas als auch bei der Messung der APC-Konzentration des Verdünnungspuffers verwendet.

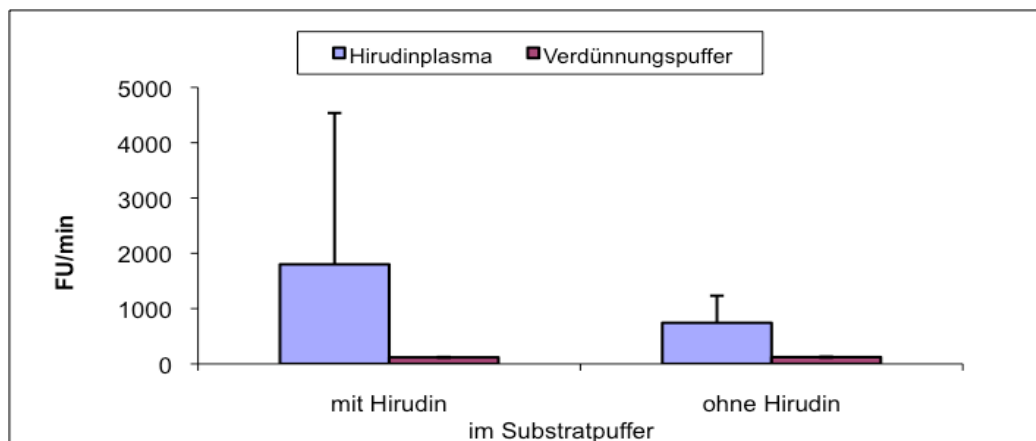


Abb. 31: Einfluss von Hirudin im Substratpuffer (10 µg/ml) auf die Messung des Substratumsatzes im Verdünnungspuffer und Hirudinplasma

Wie anhand der Abbildung ersichtlich ist, kommt es in dem Ansatz mit Hirudin im Substratpuffer zu deutlich stärkeren Abweichungen des Substratumsatzes als bei dem Ansatz mit herkömmlichem Substratpuffer.

b) Die Messung von Hirudinplasma und Poolplasma ohne Streptavidinbeschichtung der wells Vorüberlegung zu diesem Versuch war, dass das wiederholte Auftreten der Ausreißer möglicherweise durch Enzyme bedingt ist, die unspezifisch an Streptavidin binden. Durch diese unspezifische Enzymbindung besteht die Möglichkeit, dass es zu einer erhöhten Hydrolyserate des chromogenen Substrats kommt. Für die Hypothese, dass die Ausreißer von Enzymen hervorgerufen werden, spricht die Tatsache, dass sie bei einer Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Pefablock eliminiert werden konnten. Lassen sich die Ausreißer durch diesen Versuch minimieren oder gänzlich unterbinden, ist es möglich, dass ein Zusammenhang mit der Streptavidinbeschichtung besteht.

Für diesen Versuch wurde sowohl Hirudin- als auch gepooltes Citratplasma verwendet, welches mit 20 μM Aprotinin sowie 40 $\mu\text{g/ml}$ Hirudin versetzt wurde. Zunächst wurde in jedem well 1,5 pmol Aptamer/100 μl für zwei Stunden inkubiert. Da die wells wurden zuvor jedoch nicht mit Streptavidin beschichtet wurden, bestand für die Aptamere theoretisch keine Bindungsmöglichkeit. Nach Auswaschen der Aptamere wurde die Mikrotiterplatte mit den Plasmaproben beschichtet und für weitere 2 Stunden inkubiert. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Plasmaproben durch erneutes Waschen entfernt und nach Auftragen des chromogenen Substrats der Umsatz gemessen.

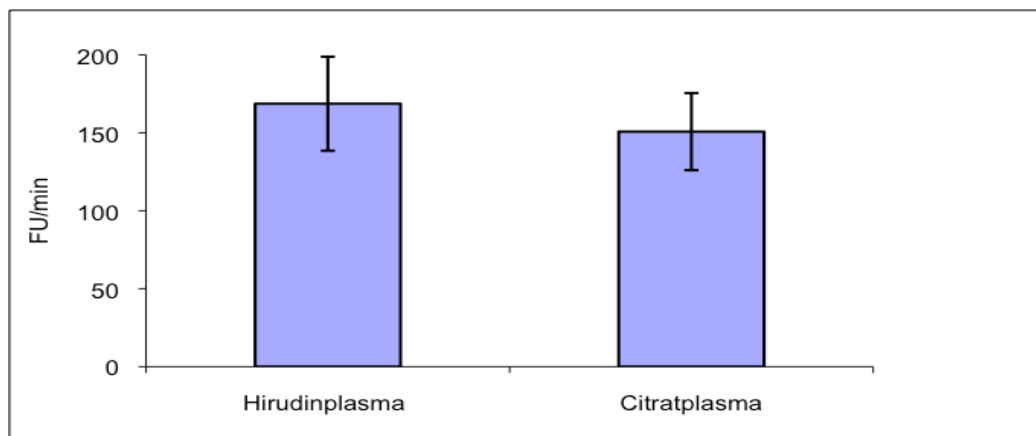


Abb. 32: Messung des Substratumsatz von Hirudin- & Citratplasma ohne Streptavidinbeschichtung der wells

Sowohl im Hirudin- als auch im Citratplasma kam es in Abwesenheit von Streptavidin nicht zum Auftreten von überschüssigen Substratumsätzen. Der Mittelwert des Substratumsatzes betrug in Hirudinplasma $168,7 \pm 30,2$ FU/min und in Citratplasma $150,7 \pm 24,7$ FU/min.

c) Die Messung der APC-Konzentration von Hirudinplasma mit und ohne vorherige Aptamerbeschichtung der wells sowie mit und ohne Streptavidinbeschichtung

Eine weitere mögliche Ursache für das Ausreten von Ausreißern liegt in der Beschichtung der wells mit den Aptameren. Um dies zu überprüfen, wurde ein Versuch durchgeführt, der dem unter Punkt b) beschriebenen ähnelt. In diesem Versuch wurde aber zwischen drei verschiedenen Ansätzen unterschieden:

1. Keine Beschichtung der wells mit Streptavidin und Aptameren
2. Beschichtung der wells nur mit Streptavidin
3. Beschichtung der wells mit Streptavidin und Aptameren

Die Messung der APC-Konzentration erfolgte in Hirudinplasma.

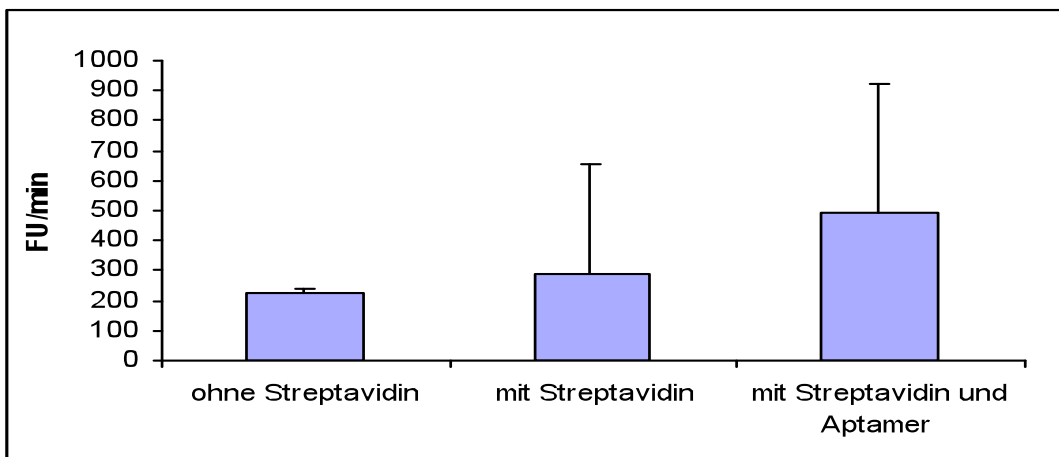


Abb. 33: Messung des Substratumsatzes von Hirudinplasma

1. Keine Beschichtung der wells mit Streptavidin und Aptameren
2. Beschichtung der wells nur mit Streptavidin
3. Beschichtung der wells mit Streptavidin und Aptameren

Während es bei der Messung der APC-Konzentration ohne vorherige Beschichtung der wells mit Streptavidin nicht zum Auftreten von Ausreißern kommt, zeigt sich bei der Messung mit Streptavidinbeschichtung – und zwar sowohl mit als auch ohne Aptamere – ein vermehrtes Auftreten von Ausreißern und dadurch bedingt eine erhöhte Standardabweichung.

4 Diskussion

Ihre Bindungseigenschaften und das einfache und schnelle Herstellungsverfahren prädisponieren den Einsatz von Aptameren als vielversprechende Kandidaten in der Entwicklung eines Messverfahrens zum Nachweis von APC. Ihre einzigartige dreidimensionale Struktur ermöglicht es den Aptameren, selektiv an bestimmte Proteine zu binden. Schon Gal et al. entwickelte 1998 ein aus 167 Basen bestehendes RNA-Aptamer, welches mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \sim 100$ nM an humanes APC bindet (Gal et al., 1998). Ein Nachteil dieses Aptamers ist, dass es die Proteasefunktion des APC inhibiert und damit auch die Umsetzung eines Peptidsubstrats hemmt. Hinzu kommt, dass eine mögliche Kreuzreaktion mit Protein C, welches unter physiologischen Bedingungen eine etwa 1.000-fach höhere Plasmakonzentration aufweist, nicht überprüft wurde. Das Bestreben, die endogene APC-Plasmakonzentration exakt und zuverlässig zu bestimmen, ist nicht neu. Zwar ist es bereits einigen Arbeitsgruppen gelungen, die APC-Konzentration im Plasma zu quantifizieren, allerdings erwiesen sich diese Testverfahren als nicht sensitiv genug und benötigten je nach Testsystem Inkubationszeiten von 19 Stunden bis hin zu drei Wochen, was für die Anwendung im Rahmen der klinischen Routinediagnostik eine zu lange Zeitspanne ist.

Liaw et al. gelang es mittels eines nur schwach mit Protein C kreuzreagierenden, monoklonalen Antikörpers die Konzentration von APC zu bestimmen (Liaw et al., 2003). Allerdings erwies sich diese Nachweismethode als nicht spezifisch genug gegenüber APC, da Protein C schon in physiologischer Konzentration (3-5 $\mu\text{g/ml}$) etwa 20 % der Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers blockierte. Ein weiteres Messverfahren, das auf einem enzym capture assay (ECA) basiert, konnte zwar APC-Konzentrationen ab 0,3 ng/ml zuverlässig messen, jedoch waren aufgrund der sehr geringen Plasmakonzentration von APC die Inkubationszeiten zu lang (Gruber und Griffin, 1992).

Die Überlegung, die hinter der Entwicklung des hier beschriebenen oligonucleotide assays zum Nachweis von APC steht, ist die Tatsache, dass das HS02-Aptamer aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur in der Lage ist, selektiv an APC zu binden, ohne dabei die Funktion des Enzyms zu inhibieren (Müller et al., 2009). Um APC mit Hilfe eines Peptidsubstrats nachweisen zu können, ist dieser Umstand von herausragender Bedeutung. Interaktionen zwischen dem HS02-Aptamer und dem APC verändern zwar die Proteaseaktivität insofern, dass die antikoagulatorischen Funktionen des APC gehemmt werden – die antiapoptotischen sowie zytoprotektiven Eigenschaften werden hiervon jedoch nicht beeinflusst. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte

die Bindungsstelle des HS02-Aptamers an der basischen Exosite des APC lokalisiert werden (Müller *et al.*, 2009). Die aufgeführten Charakteristika zeichnen das exosite-spezifische Aptamer als ein erfolgversprechendes Hilfsmittel in der Entwicklung dieses Assays sowie als ein potentielles therapeutisches Agens aus, das für die selektive Kontrolle der antikoagulatorischen Aktivität des APC eingesetzt werden kann.

4.1 Die Rolle des Aprotinins

Da die APC-Aktivität in Blut beziehungsweise Plasma durch dort befindliche Serpine schrittweise gemindert wird, wurde ein reversibler Inhibitor des APC benötigt, um die irreversible Inhibition von APC zu verhindern und um auf diese Weise zu gewährleisten, dass die APC-Konzentration nicht falsch niedrig gemessen wird. Aufgrund einer Interaktion zwischen dem aktiven Zentrum des APC und dem der Serpine kommt es zu einer irreversiblen Inaktivierung und damit folglich zu einer Aktivitätsabnahme des APC. Von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung stöchiometrischer Komplexe zwischen APC und dem Serpin ist der reaktive center loop (RCL) des Serpins, der in der Regel aus 20 Aminosäuren besteht und maßgeblich zur Serpinprotease-Interaktion beiträgt (Rau *et al.*, 2007). Eine Blockade des aktiven Zentrums des APC führt dazu, dass ein nukleophiler Angriff auf die Peptidbindungen im RCL verhindert wird. Die Spaltung dieser Peptidbindung ist jedoch obligat für die uneingeschränkte Funktionsfähigkeit des Serpins (Rau *et al.*, 2007). Anhand von Studien, in denen die Interaktion zwischen APC und nicht-plasmatischen Inhibitoren untersucht wurde, konnte nachgewiesen werden, dass Aprotinin mit einer K_i von 1,35 $\mu\text{mol/L}$ ein äußerst potenter kompetitiver Inhibitor des APC ist (Taby *et al.*, 1990). Aufgrund der reversiblen Enzyminhibition durch Aprotinin kann das APC zum einen nicht von den sich im Plasma befindenden Serpinen inhibiert werden und wird zum anderen gegen eine irreversible Komplexbildung und einer damit einhergehenden Inaktivierung geschützt.

Wie sich anhand der unter Punkt 3.9 aufgeführten Versuche nachweisen lässt, gewährleistet die Anwesenheit von Aprotinin über die gesamte Inkubationszeit hinweg, dass die Aktivität des APC erhalten bleibt und somit im Rahmen der Bestimmung der APC-Plasmakonzentration keine falsch niedrigen Werte gemessen werden. Um den Einfluss von Aprotinin auf die Messung der APC-Konzentration im Plasma beziehungsweise in Verdünnungspuffer ermitteln zu können, wurden vergleichende Messungen sowohl ohne Zusatz von Aprotinin als auch mit Aprotininkonzentrationen zwischen 0,2 μM und 20 μM durchgeführt. Wie sich herausstellte, spielte die Konzentration des Aprotinins nur eine untergeordnete Rolle. Sowohl bei Konzentrationen von 0,2 μM

als auch von 20 μM zeigte sich der stabilisierende Effekt des Aprotinins auf das APC, was sich in nur geringfügigen Unterschieden in den Umsatzraten des flourogenen Substrats bemerkbar machte. Die Gabe von Aprotinin führt zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Medium und könnte somit eine mögliche Ursache für höhere Substratumsätze sein. Wie mit Hilfe der Ergebnisse jedoch verdeutlicht werden konnte (siehe Punkt 3.1), wiesen die Substratumsätze in den unterschiedlichen Ansätzen nur geringe Unterschiede auf. Diese Tatsache verdeutlicht, dass im Rahmen der einzelnen Waschzyklen das Aprotinin suffizient aus den einzelnen wells entfernt werden kann, die Aktivität des APC gegenüber dem flourogenen Peptidsubstrat wieder hergestellt ist und der Umsatz dessen nicht beeinflusst wird.

Die irreversible Hemmung der APC-Aktivität *in vitro* würde die gemessene APC-Plasmakonzentration mindern. Um dies zu verhindern, wurde bei der Blutabnahme und bei der Bearbeitung von Poolplasmaproben Aprotinin zugefügt und somit die Aktivität des APC reversibel inhibiert. Durch Mischen des Blutes mit dem Inhibitor direkt bei der Blutabnahme kann angenommen werden, dass in diesen wenigen Sekunden der Herstellung eines homogenen Mischverhältnisses keine signifikante Menge an APC inhibiert oder generiert wurde. Die Zugabe von Aprotinin konnte dementsprechend eine irreversible Hemmung des APC verhindern. Nach Inkubation des Plasmas in den Mikrotiterplatten für die Dauer von zwei Stunden wurde das Aprotinin mit Hilfe von viermalig durchgeführten Waschzyklen entfernt und dadurch die Aktivität des APC wiederhergestellt, damit dieses das eingesetzte flourogene Substrat enzymatisch spalten kann.

4.2 Die Rolle der Aptamere

Die aus 88 Basen bestehenden verwendeten HS02-Aptamere waren an ihrem 3'-Ende biotinyliert, was die Bindung zwischen den Aptameren und dem Streptavidin ermöglichte. Das Streptavidin, welches zuvor in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten immobilisiert wurde, diente als Anker für die Aptamere. Die Affinität zwischen Biotin und Streptavidin ist extrem hoch ($K_D \approx 10^{-15}$ M) und gewährleistet eine feste und zuverlässige Bindung der Aptamere in den einzelnen wells (*Laitinen et al., 2006*). Die Aptamere, die spezifisch und hoch affin aktiviertes Protein C binden, mussten für eine bestimmte Zeit in den mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten inkubieren (*Müller et al., 2009*). Die Vermutung lag nahe, dass eine längere Inkubationszeit der Aptamere zu einer Verbesserung des Messergebnisses führen würde. Wie sich jedoch anhand der Versuchsergebnisse unter Punkt 3.3 zeigte, war dies im Vergleich zu einer nur einstündigen Inkuba-

tionszeit nicht der Fall. Um die Bestimmung der APC-Konzentrationen – auch im Hinblick auf die spätere diagnostische Anwendung – in möglichst geringer Zeit durchführen zu können, wurde mit Aptamerinkubationszeiten von einer Stunde fortgefahren. Zur Ermittlung der optimalen Aptamerkonzentration wurden Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, die zum Ergebnis kamen, dass eine Konzentration von 2,5 pmol/100 µl zu einem nahezu identischen Substratumsatz führte wie eine Aptamerkonzentration von 1,5 pmol/100 µl. Um ein Testsystem entwickeln zu können, das nicht nur in höchstem Maße sensitiv und spezifisch ist, sondern auch im Hinblick auf ökonomische Gesichtspunkte den Anforderungen entspricht, wurden die weiteren Versuche mit Aptamerkonzentrationen von 1,5 pmol/100 µl fortgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass ohne Beschichtung der wells mit Aptameren bei ansonsten regelgerechtem Versuchsablauf keine zuverlässige Messung der APC-Konzentration möglich war, konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Aptamere im Rahmen dieser Testkonfiguration fähig sind, APC zu binden. Der Umsatz des flourogenen Substrats blieb auf dem Niveau des Leerwerts. Das APC, das zuvor in bestimmten Konzentrationen in das Poolplasma pipettiert wurde, konnte aufgrund der Abwesenheit der Aptamere nicht in den wells binden und wurde beim darauffolgenden Waschzyklus wieder entfernt. Folglich konnte das flourogene Substrat nicht enzymatisch gespalten werden, was dazu führte, dass die Substratumsätze trotz unterschiedlicher APC-Konzentrationen nahezu auf dem Niveau der Plasmaprobe ohne APC blieben. Für das Testverfahren essentiell sind letztendlich die Aptamere, die eine zuverlässige Bindung des zu quantifizierenden APC in den wells gewährleisten und so dafür sorgen, dass im folgenden Schritt das Peptidsubstrat proteolytisch gespalten werden kann. Da jedoch in den Plasmaproben mit steigenden APC-Konzentrationen eine geringe enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass eine minimale Menge des APC unabhängig von den Aptameren unspezifisch in den wells gebunden wird und damit für eine gewisse Grundumsatzrate des flourogenen Substrats verantwortlich ist. Diese Aptamer-unabhängige Bindung kann auf Interaktion des APC sowohl mit Streptavidin als auch mit den Wänden der einzelnen wells zurückzuführen sein. Zur Reduktion der freien Bindungen wurde die Mikrotiterplatte nach der Beschichtung der einzelnen wells mit Streptavidin über zwei Stunden mit BSA-haltigem Blockpuffer beschichtet. Durch die Inkubation des Blockpuffers konnte gewährleistet werden, dass diese Aptamer-unabhängigen Bindungsstellen auf ein Minimum reduziert wurden. Wie anhand der Ergebnisse unter Punkt 3.5 verdeutlicht werden konnte, kam es somit erst ab unphysiologisch hohen APC-

Konzentrationen von etwa 1 ng/ml zu Interaktionen zwischen APC und den einzelnen wells, was einen erhöhten Umsatz des flourogenen Substrats zur Folge hatte.

4.3 Vergleich zwischen rekombinatem und plasmatischem aktivierten Protein C

Um sicherzustellen, dass sowohl die Plasmakonzentration von rekombinatem als auch von endogenem APC mit Hilfe dieses Testverfahrens zuverlässig ermittelt werden kann, war ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung des APC-Assays die vergleichende Messung zwischen rekombinant hergestelltem APC (Drotrecogin alpha) sowie nativem, humanem Protein C, das nachträglich aktiviert wurde (aktiviertes Ceprotin, aCEP; siehe Punkt 2.2.4). Hierbei stand die Erfassung der Bindungsaffinität des aktivierten Ceprotins im Vergleich zu Drotrecogin alpha im Vordergrund. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass aktiviertes Ceprotin im Vergleich zu Drotrecogin alpha mit etwas geringerer Aktivität vom Testsystem erfasst wird. So konnte bewiesen werden, dass sowohl endogenes als auch rekombinant hergestelltes APC unter Verwendung dieses Assays gemessen werden können. Auffällig hierbei war jedoch, dass die Aktivität des endogenen APC um etwa 25% unter dem gemessenen Wert des rekombinant hergestellten APC liegt. Eine mögliche Ursache für diese Messdifferenz können unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen aCEP beziehungsweise Drotrecogin alpha und den Aptameren sein. Die Affinität des HS02-Aptamers gegenüber aCEP beträgt $K_D = 0,47 \pm 0,66$ nM im Vergleich zu einer Bindungsaffinität für rekombinantes APC von $K_D = 0,43 \pm 0,08$ nM (Müller *et al.*, 2009). Weitere potenzielle Fehlerquellen können im Rahmen der Aktivierung des Ceprotin aufgetaucht sein. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass die amidolytische Aktivität des APC falsch bestimmt oder aber anhand der Verminderung des Protein C-Antigens eine falsche APC-Konzentration errechnet wurde. Die Konzentrationbestimmung von PC im Plasma fand sowohl unter Zuhilfenahme der PC-Aktivitätsbestimmung als auch des PC-Antigens (Vidas® Protein C) statt. Aufgründessen konnte eine PC-Konzentration von $3,35 \pm 0,09$ µg PC in einer Unit Ceprotin ermittelt werden. Die Generierung von APC wurde über die Abnahme des PC-Antigens und der Messung der APC-Aktivität verfolgt, da das auf Antikörpern basierende Testverfahren von Vidas® nicht sensitiv genug gegenüber APC war. Im Rahmen dieser Aktivierung von humanem Plasma-PC kann es zu Messungenauigkeiten gekommen sein, welche sich nun in Bestimmung der APC-Plasmakonzentration widerspiegeln.

Im Zusammenhang mit rekombinant hergestelltem Protein C ist darauf hinzuweisen, dass die Gabe desselben zu erhöhten APC-Konzentrationen im Plasma von Patienten führte. Mit Hilfe des APC-Assays könnte es gelingen, diese APC-Erhöhung zu quantifizieren und dadurch therapeutischen und diagnostischen Nutzen zu erlangen. In Studien zeigte sich, dass die Anwendung von Protein C-Konzentrat aufgrund seiner antiinflammatorischen und antikoagulatorischen Eigenschaften einen positiven Effekt sowohl bei der entzündlichen Purpura fulminans als auch bei der schweren Sepsis hat (*Baratto et al., 2008; Schellongowski et al., 2006; Spiel et al., 2005*). Durch die Gabe von Drotrecogin alpha konnte beispielsweise die Sterblichkeit von Patienten, die an einer schweren Sepsis erkrankt waren, signifikant verringert werden (*Bernard et al., 2001*). Die dabei auftretenden unerwünschten Wirkungen wie eine erhöhte Blutungsrate schränken die Anwendung von Drotrecogin alpha im klinischen Alltag jedoch ein (*Levi, 2008*).

4.4 Die Wahl des Peptidsubstrats

Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität des APC erfolgte unter Verwendung eines synthetischen Peptidsubstrats, das infolge der enzymatischen Aktivität des APC gespalten wurde. Um das Substrat mit einer hohen Spezifität und auch einer schnellen Umsatzrate verwenden zu können, wurden zwei verschiedene fluorogene Substrate, die spezifisch und selektiv gegenüber APC sind, miteinander verglichen. Diese beiden Substrate unterschieden sich sowohl in ihrer Umsatzrate als auch in ihrem K_M -Wert. Während das Peptidsubstrat Pefa 5791 einen K_M -Wert von 0,56 mM sowie eine Umsatzrate k_{cat} von 62 s^{-1} aufweist, beträgt der K_M -Wert des Peptidsubstrats Pefa 3342 0,26 mM bei einer Umsatzrate von $8,5 \text{ s}^{-1}$. Die Michaelis-Konstante K_M ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms gegenüber seinem Substrat. Je kleiner der K_M -Wert umso höher die Affinität. Anhand der Versuchsergebnisse zeigte sich, dass der Substratumsatz des Peptidsubstrats Pefa-5791 deutlich höher ist als der des Pefa-3342. Die Konzentrationsunterschiede hingegen haben nur einen geringen Einfluss auf den Umsatz.

Um den APC-Assay in möglichst geringer Zeit durchführen zu können und damit auch einer möglichen klinischen Anwendung gerecht zu werden, war die Durchführung der APC-Bestimmung unter Zuhilfenahme des Peptidsubstrats mit der schnelleren Umsatzrate dem mit der geringeren Umsatzrate vorzuziehen.

4.5 *Verschiedene Plasmaverdünnungen und Inkubationszeiten*

Damit dem im Plasma befindlichen APC die Gelegenheit gegeben werden kann, an die Aptamere in den Mikrotiterplatten zu binden, war eine gewisse Inkubationszeit erforderlich. Zur Gewährleistung einer zuverlässigen Messung müssen die Aptamere das APC aus dem Plasma möglichst effektiv binden. Wie die Ergebnisse unter Punkt 3.7 unterstreichen, war der Umsatz des flourogenen Substrats nach einer Inkubationszeit des Plasmas über zwei Stunden in der Mikrotiterplatte am höchsten. Aufgrund dieser Tatsache ließ sich schlussfolgern, dass die Aptamere nach kürzerer Inkubationszeit noch nicht vollständig erfasst werden konnten und folglich falsch niedrige APC-Konzentrationen ermittelt wurden. Des Weiteren spielte die Konzentration des Plasmas eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der APC-Konzentration. Um hierbei das bestmögliche Konzentrationsverhältnis ermitteln zu können, wurden Versuche mit unterschiedlichen Plasmaverdünnungen durchgeführt. Zur Verdünnung des Plasmas wurde Verdünnungspuffer verwendet. Die zugrundeliegende Überlegung bei diesem Versuch war, mit einer Verdünnung des Plasmas eine Reduzierung der Plasmamatrix zu erreichen und so Messungenauigkeiten, die auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind, auf ein Minimum zu verringern. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Verdünnung des Plasmas der Umsatz des flourogenen Substrats sank und die ermittelten APC-Konzentrationen dementsprechend geringer ausfielen. Die APC-Konzentrationen konnten in unverdünntem Plasma am genauesten gemessen werden. Es war weder ein negativer Einfluss der Plasmamatrix zu beobachten noch konnte eine Verdünnung einen Vorteil erbringen. Diese Fakten sprechen für die äußerst hohe Spezifität des HS02-Aptamers.

Die Konzentration von zirkulierendem APC im Blut ist enorm gering – nach bereits durchgeführten Studien zwischen 0,32ng /ml bis 3,2 ng/ml –, während der Protein C-Gehalt im Vergleich dazu relativ hoch ist. Auch bei einer Verdünnung bleibt dieses Verhältnis zwischen APC und PC konstant. Entscheidend ist, dass die Verdünnung so gewählt wird (in bisher entwickelten Testverfahren teilweise bis zu 30-fach), dass APC und PC komplett binden und anschließend die Unterscheidung zwischen APC und PC durch die Art des Nachweissystems erfolgen kann (*Gruber und Griffin, 1992; Liaw et al., 2002*). Eine Verdünnung kann jedoch unter Verwendung des HS02-Aptamers umgangen werden, welches eine hohe Spezifität gegenüber APC aufweist und auch in unverdünntem Plasma die zuverlässigsten Ergebnisse erbringt (*Müller et al., 2009*).

4.6 Die Waschzyklen

Nach zweistündiger Inkubation des APC in den Mikrotiterplatten wurden die überschüssigen Proteine und das Aprotinin mit Hilfe von Waschpuffer durch automatische Waschzyklen entfernt. Basierend auf den Versuchsergebnissen wurden die Waschzyklen viermal wiederholt, um eine komplette Entfernung des Aprotinins und der Plasmaenzyme zu gewährleisten, die unspezifisch in den wells gebunden haben könnten. Es stellte sich heraus, dass nach genau vier Waschzyklen die Diskrepanz zwischen dem Leerwert und einer APC-Konzentration von 0,01 ng/ml am signifikantesten war, was bedeutet, dass nach dieser bestimmten Anzahl von Waschzyklen bestmöglich zwischen kleinsten Konzentrationsunterschieden diskriminiert werden kann. Mit dem Auswaschen des Aprotinins wurde die enzymatische Aktivität des APC wiederhergestellt, das so die Spaltung des flourogenen Substrats katalysieren und eine Absorbtiionsänderung erwirken konnte.

4.7 Die Halbwertszeit von APC

APC ist labil und weist eine zeitabhängige Abnahme seiner Aktivität auf. Die Halbwertszeit beträgt in Citratplasma bei Lagerung der Proben bei Raumtemperatur etwa 25 Minuten. Diese Aktivitätsabnahme ist auf die Interaktion zwischen dem aktiven Zentrum des APC und dem reaktiven Zentrum von Serpinen zurückzuführen, die die irreversible Inaktivierung des APC nach sich zieht (*Rau et al., 2007*). Um dieser Inaktivierung während der Probenentnahme und -zubereitung vorzubeugen, wurde der Einfluss von Aprotinin, einem reversiblen, kompetitiven Inhibitor, auf die Auswirkungen der Halbwertszeit von APC untersucht. Mit der Anlagerung von Aprotinin an das aktive Zentrum des APC und der damit einhergehenden Blockade desselben kommt es zu einer reversiblen Aktivitätshemmung des Enzyms. Die Gabe von Aprotinin kann eine effektive Komplexbildung zwischen APC und seinen irreversiblen Inhibitoren verhindern und dadurch die Halbwertszeit des APC verlängern.

Um die Haltbarkeit des APC sowohl in Vollblut als auch in Plasma bestimmen zu können, wurden Versuche in Citratplasma durchgeführt, bei denen über einen Zeitraum von 48 Stunden die verbleibende APC-Konzentration zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt wurde. Zudem wurde der Effekt von Aprotinin auf die Halbwertszeit von APC untersucht. Anhand dieser Ergebnisse wurde in Abwesenheit von Aprotintin eine Halbwertszeit in Vollblut von 108 Minuten bei Lagerung der Blutproben auf Eis und eine Halbwertszeit von 39 Minuten bei Raumtemperatur errechnet. Die Plasmahalbwertszeit von APC in Abwesenheit von Aprotintin betrug auf Eis 46 Minuten

und bei Raumtemperatur 25 Minuten. Wie mittels der Ergebnisse unter Punkt 3.9 dargestellt, konnte sowohl in Vollblut als auch in Plasma die Halbwertszeit durch Zugabe von Aprotinin in einer Konzentration von 10 μM enorm verlängert werden. So blieb die APC-Konzentration in Anwesenheit von Aprotinin über längere Zeit nahezu konstant. Diese Tatsache erweist sich als erheblicher Vorteil sowohl in der Durchführung von weiteren Studien als auch im Rahmen der klinischen Diagnostik, da anhand einer Verlängerung der Halbwertszeit gewährleistet werden kann, dass die APC-Konzentration im Plasma über längere Zeit hinweg stabil bleibt und dadurch keine falsch niedrigen Konzentrationen gemessen werden.

In anderen Studien wurde eine APC-Halbwertszeit in Vollblut von 27 ± 10 Minuten, in Citratplasma von etwa 30 Minuten und bei Infusion in einen menschlichen Organismus von 22 Minuten gemessen, was sich mit den hier ermittelten Resultaten deckt (*Gruber und Griffin, 2002; Okajima et al., 1990; Orthner et al., 1993*). Wie bereits erläutert, wird APC sowohl in vivo als auch in vitro durch im Plasma befindliche Serpine inaktiviert (*Rau et al., 2007*). In Plasma und auch in Vollblut kann die Halbwertszeit durch Lagerung der Proben auf Eis deutlich verlängert werden. Diese Verlängerung ist am ehesten auf eine Aktivitätsreduktion der Serpine zurückzuführen. Diese weisen bei geringerer Temperatur eine geminderte enzymatische Wirksamkeit auf, weshalb mehr Zeit zur Inaktivierung des APC benötigt wird.

Diese Ergebnisse belegen zum einen, dass bei der zuverlässigen Bestimmung der APC-Konzentration in Plasmaproben die Zugabe von Aprotinin von enormen Nutzen ist und zum anderen, dass eine Lagerung des zu bestimmenden Plasmas auf Eis zu einer weiteren Verlängerung der Halbwertszeit führt.

4.8 Der Einfluss von Protein C

Mit Hilfe des unter Punkt 3.10 beschriebenen Versuches sollte der Einfluss ansteigender Protein C-Konzentrationen auf die Messung der APC-Aktivität ermittelt werden. Hierzu wurde eine Versuchsreihe in kommerziell erworbenem Protein C-Mangelplasma mit unterschiedlichen Protein C-Konzentrationen erstellt, wobei Ceprotin als Protein C-Quelle diente. Die Basis bildeten sechs verschiedene Versuchsansätze mit aufsteigenden Protein C-Konzentrationen (0-8 U/ml). Sowohl bei APC-Konzentrationen in gepooltem Citratplasma von 0,5 ng/ml als auch 0,05 ng/ml wurde untersucht, inwiefern unterschiedliche Protein C-Konzentrationen mit der APC-Bindung der Aptamere konkurrieren. Hierbei zeigte sich, dass Protein C nahezu keine Auswirkungen auf die

Messung der APC-Plasmakonzentration hat. Erst in höheren, unphysiologischen Konzentrationen kommt es zu einer Beeinflussung des Messergebnisses.

Bei der Aktivierung von PC kommt es zu einer Abspaltung des aus elf Aminosäuren bestehenden Aktivierungspeptids (*Jackson und Xue, 2008*). Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit zwischen APC und Protein C lag die Vermutung nahe, dass ein enormer quantitativer Überschuss an Protein C zu einer Beeinträchtigung der Bindung zwischen APC und den Aptameren führt. Dies würde sich bei der Messung in einer verminderten APC-Konzentration widerspiegeln, da das Protein C zwar Bindungsstellen blockiert, jedoch nicht in der Lage ist, das flourogene Substrat umzusetzen. Entgegen der Erwartungen kam es in beiden Versuchsansätzen zu einem Anstieg der gemessenen APC-Konzentration. Für diese Messergebnisse können mehrere Gründe verantwortlich sein. Es besteht die Möglichkeit, dass bei einem Überschuss von Protein C die Bindung von APC an die Aptamere erleichtert wird. Zwar konnte in Filterretentions-Analysen gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität des HS02-Aptamers gegenüber APC etwa 200-mal höher ist als seinem Zymogen gegenüber. Es lässt sich jedoch die Vermutung anstellen, dass PC, welches, wie bereits erläutert, strukturell nur geringe Unterschiede zu seiner aktiven Form aufweist, in derart hohen Konzentrationen Einfluss auf die APC-Konzentrationsbestimmung ausüben kann (*Müller et al., 2009*). Ferner können sich erhöhte Protein C-Konzentrationen auf den Umsatz des flourogenen Substrats auswirken, was eine Zunahme der Umsatzrate desselben nach sich ziehen könnte. Als Vermutung kann angeführt werden, dass die kinetischen Parameter des synthetischen Substrats durch die Gegenwart unphysiologisch hoher Protein C-Konzentrationen verändert werden. Die naheliegendste Erklärung für die beobachtete Zunahme der Substratumsatzrate ist jedoch, dass es durch Zugabe von Captoprin auch zu einem Anstieg der APC-Konzentration im Citratplasma kam. Während des Herstellungsprozesses von Captoprin aus Humanplasma kommen mehrere Ionenaustauschchromatographieschritte zur Anwendung, denen sich eine Immunaффinitätschromatografie anschließt, wobei Protein C unter Verwendung monoklonaler Antikörper aus Plasma angereichert und hochrein dargestellt wird (*Baxter*). Möglicherweise kommt es im Rahmen der Generierung von Captoprin, welches in diesem Versuch als Protein C-Quelle diente, durch Aufreinigung von Protein C zeitgleich zu einer Zunahme der APC-Konzentration. Dies würde die steigenden APC-Konzentrationen mit Zunahme des Captoprin-Gehalts begründen. Hervorzuheben ist, dass mit diesem Versuch – gerade im Hinblick auf die Anwendung als klinisches Testverfahren – gezeigt werden konnte, dass Protein C-Konzentrationen zwischen 0% und 200% der physiologischen Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Bestimmung der APC-

Konzentration haben. Bei den meisten Patienten mit einer Sepsis kommt es zu einem Abfall der Protein C-Konzentration, sodass im Rahmen dieses Assays keine Beeinflussung durch Protein C zu erwarten ist. In anderen Testverfahren, bei denen die APC-Konzentration im Plasma mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gemessen wurde, blockierte Protein C in physiologischer Konzentration (3-4 $\mu\text{g/ml}$) etwa 20% der Bindungsstellen und führte dadurch zu einem Fehler in der Konzentrationsbestimmung des APC (*Liaw et al., 2003*).

Die Fähigkeit der HS02-Aptamere, signifikant zwischen APC und seinem Zymogen diskriminieren zu können, prädisponieren sie als vielversprechende Liganden im Rahmen dieses Assays. Wie bereits erwähnt, ist die Bindungsaffinität des HS02-Aptamers gegenüber PC 200-mal schwächer als gegenüber APC (*Müller et al., 2009*). Bisher konnte erst ein monoklonaler Antikörper (HAP 1555) entwickelt werden, der APC gegenüber eine zehnfach höhere Affinität als PC gegenüber hat (*Esmon et al., 2002*). Diese Tatsache ist ein grundlegendes Kriterium bei der Entwicklung des hier beschriebenen Testverfahrens, da unter physiologischen Bedingungen die Plasmakonzentration von PC etwa 1000-fach höher ist als die von APC (*Müller et al., 2009*).

4.9 Die Reproduzierbarkeit des Testverfahrens

Wie sich angesichts der Inter- und Intra-Assay-Variabilitäten zeigt, lässt sich die Messung sowohl bei hohen als auch bei geringen APC-Konzentrationen äußerst genau reproduzieren. Anhand des Variationskoeffizienten, der je nach eingesetzter APC-Konzentration zwischen 1% und 15% liegt, lässt sich erkennen, dass die Streuung der jeweiligen Ergebnisse auf ein Minimum beschränkt ist. Auffällig hierbei ist, dass bei APC-Konzentrationen von 0,1 ng/ml und weniger der Variationskoeffizient etwas größer wird. Generell nehmen die Schwankungen der Messergebnisse bei niedrigen Werten zu. Beispielsweise ergab die Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität bei einer APC-Konzentration von 2 ng/ml einen Mittelwert von 1,896 ng/ml mit einer Standardabweichung von 0,069 ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 3,643 %. Im Unterschied dazu wurde bei APC-Konzentrationen von 0,02 ng/ml ein Mittelwert von 0,015 ng/ml mit einer Standardabweichung von 0,002 ng/ml und einem Variationskoeffizienten von 13,305 % errechnet.

Hervorzuheben ist, dass mit diesem Testverfahren erstmals zuverlässig und reproduzierbar APC-Konzentrationen von 0,05 ng/ml und weniger gemessen werden können. Bei bisher angewandten Messverfahren lag die Nachweisgrenze zwischen 0,3 und 50 ng/ml APC (*Gruber und*

Griffin, 1992; Liaw et al., 2003). Dieses Assay bietet die Möglichkeit, APC-Konzentrationen von mehr als einer Zehnerpotenz kleiner bei einer Messdauer von etwa drei Stunden reproduzierbar zu ermitteln.

4.10 Die Leerwert-Problematik

Trotz der im Plasma physiologisch vorkommenden Inhibitoren von APC wie PCI, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Antiplasmin konnten nach Lagerung der Poolplasmaproben bei -80°C geringe Konzentrationen von APC nachgewiesen werden. Offenbar kam es nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Um dies zu beweisen, wurden Poolplasmaproben mit Protein C-Mangelplasma, in dem definitionsgemäß der Gehalt an APC verschwindend gering ist, miteinander verglichen. Wie sich herausstellte, lag der Gehalt von APC in Poolplasma mit einem Mittelwert von $0,049 \text{ ng/ml} \pm 0,005$ signifikant über dem der APC-Konzentration in Protein C-Mangelplasma mit einem Mittelwert von $0,035 \text{ ng/ml} \pm 0,004$. Dieses Ergebnis unterstreicht die These, dass die in vivo vorkommenden Inhibitoren von APC nicht zu einer vollständigen Inaktivierung führen.

Die Versuche wurden in gepooltem Citratplasma durchgeführt. Während in Gegenwart von Heparin gezeigt werden konnte, dass mehr als 95 % des APC Komplexe mit dem Protein C-Inhibitor sowie mit α_1 -Antithrombin bildet, besteht die Möglichkeit, dass in Citratplasma weniger APC komplexiert wird und dadurch im Rahmen dieses Testverfahrens auch nach längerer Lagerung noch eine geringe APC-Konzentration gemessen werden kann (Tabanero et al., 1990). Durch Zugabe des Glykosaminoglykans Heparin kann die Komplexbildung zwischen PCI und APC und damit die Inaktivierung des APC erheblich beschleunigt werden (Aznar et al., 1996). Dies beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die Beigabe von Heparin die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen PCI-Bindungsstelle und APC beeinflusst und damit die Bildung eines ternären Komplexes aus Heparin, APC und PCI induziert (Glassock et al., 2003; Huntington, 2003). Ähnlich wie Heparin beschleunigt auch das HS02-Aptamer die Inaktivierungskinetik von APC durch PCI. Dies deutet darauf hin, dass die Aptamere nicht nur mit der Heparin-Bindungsstelle interagieren, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum des APC und dem reaktiven center loop des PCI beeinflussen (Müller et al., 2009). Ein ähnlicher allosterischer Mechanismus wurde für ein RNA-Aptamer beschrieben, das an die Exosite 2 von Thrombin bindet (Jeter et al., 2004). Im Gegensatz zu Heparin bindet das Aptamer jedoch weder an PCI noch an die APC-PCI-Komplexe. Nach der Komplexbildung zwischen APC und seinem

Inhibitor kommt es zu einer schnellen Freisetzung des Aptamers. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Aptamer-Bindungsstelle des APC nicht direkt in die Komplexbildung involviert ist, es aber bei der Interaktion zwischen APC und PCI zu einer Konformationsänderung des Epitops kommt, die zur Dissoziation des Aptamers führt (*Müller et al., 2009*).

Eine weitere Ursache für die bei der Messung auftretende erhöhte Umsatzrate wäre, dass kontaminierende Plasmaenzyme unspezifisch an die Platte gebunden haben und für eine proteolytische Spaltung des Peptidsubstrats verantwortlich sein könnten. Um diese enzymatische und mikrobielle Verunreinigung des Plasmas, des Puffers, der Platten und des Substrats zu verhindern, wurden spezielle Maßnahmen wie beispielsweise die Verwendung von sterilem Wasser und sterilen Materialien angewandt.

Hinsichtlich der Entwicklung eines möglichst sensitiven Testverfahrens zur Bestimmung der APC-Plasmakonzentration ist die Fähigkeit der Differenzierung zwischen dem Leerwert und Proben mit bestimmten APC-Konzentrationen essentiell. Um den Grundumsatz reduzieren und somit das Hintergrundrauschen eliminieren zu können, wurden vergleichende Messungen zwischen Citrat- und Hirudinplasma durchgeführt. Die antikoagulatorische Wirkung des Hirudins beruht auf einer irreversiblen Komplexbildung mit Thrombin, das daraufhin inaktiviert wird. Vorteil gegenüber anderen Antikoagulantien ist, dass Hirudin weder in die Biosynthese der Gerinnungsfaktoren eingreift, noch die Hilfe eines Kofaktor benötigt. Wie mit Hilfe der Ergebnisse veranschaulicht wurde, war der Grundumsatz bei der Messung in Hirudinplasma am geringsten. Sowohl die Bestimmung des APC-Gehalts in Citratplasma als auch in einem Citrat-Hirudinplasmagemisch imponierten durch einen erhöhten Grundumsatz. Daraus könnte geschlossen werden, dass das Citrat für das Hintergrundrauschen mitverantwortlich ist. Als weiterer möglicher Auslöser kommt eine bakterielle Kontamination der Mikrotiterplatte in Betracht, die zu einem Anstieg des Leerwerts führt. Aufgrund der Abwesenheit von Calcium-Ionen im Citratplasma kann die Bakterienmembran nicht effektiv zerstört werden, was zur Folge hat, dass die kontaminierenden Bakterien maßgeblich zu einem unspezifischen Substratumsatz beitragen können. Im Hirudinplasma dagegen wird das freie Calcium nicht komplexiert. Eine Kontaktphasenaktivierung kann als weitere Erklärung für einen Anstieg des Leerwerts in Erwägung gezogen werden. Faktor XII wird durch Kontakt mit fremden Oberflächen im Komplex mit hochmolekularem Kininogen, Präkallikrein und Kallikrein aktiviert (*Schmaier und McCrae, 2007*). Anschließend ablaufende enzymatische Prozesse könnten ebenfalls einen erhöhten Umsatz des flourogenen Substrats nach sich ziehen.

Letztendlich ist die genaue Ursache für das Phänomen des erhöhten Substratumsatzes unklar. Die vorliegenden Daten sprechen allerdings dafür, dass es einen Zusammenhang mit der Verwendung von Citratplasma gibt. Trotzdem können andere Einflüsse selbstverständlich nicht völlig ausgeschlossen werden.

4.11 Der Einfluss von DNAsen

Im Rahmen der therapeutischen Anwendung und bei der Entwicklung von Testverfahren auf Aptamer-Basis stellte sich als problematisch heraus, dass die Aptamere eine geringe Stabilität gegenüber körpereigenen Nukleasen aufweisen (*Mayer et al., 2007*). Durch die Modifikation der Aptamere an ihrem 3'-Ende konnte die Halbwertszeit sowohl in-vitro als auch in-vivo erheblich verlängert werden, ohne dabei die Funktion der Aptamere zu beeinflussen (*Burmeister et al., 2005*). Das für dieses Testverfahren entwickelte Aptamer HS02 wurde, mit Ausnahme der Biotinylierung am 3'-Ende, nicht modifiziert. Zur Ermittlung des Einflusses von Nukleasen auf die Bestimmung der APC-Plasmakonzentration wurden die Aptamere bis zu zwei Stunden den plasmatischen Nukleasen ausgesetzt. Es ergab sich hierbei keine Änderung im Messverhalten. Gerade im Hinblick auf die sehr geringen physiologischen APC-Konzentrationen ist diese Tatsache von großem Vorteil, denn schon eine minimale, von Nukleasen verursachte Messungenauigkeit würde die Sensitivität des Assays erheblich verringern.

4.12 Die Bestimmung von endogen generiertem APC

Ein Anstieg der APC-Konzentration konnte im Rahmen verschiedenster Situationen beobachtet werden. Beispielsweise wurde bei der antithrombotischen Therapie mit tissue-type Plasminogenaktivator oder Streptokinase über eine Zunahme der APC-Konzentration berichtet (*Espana et al., 2005; Gruber et al., 1993*). Darüber hinaus kann ein Anstieg der APC-Konzentration auf einen verstärkten Ablauf gerinnungsfördernder Vorgänge zurückzuführen sein, wie dies bei Operationen oder einer Hämodialyse der Fall ist (*Tagaki et al., 1999; Watanabe et al., 2000*). Aufgrund der Tatsache, dass sich die APC-Konzentration im Blut unter bestimmten Umständen verändert und somit auf mögliche Veränderungen im Gerinnungsablauf geschlossen werden kann, kann die Entwicklung eines schnellen, sensitiven und einfachen Testverfahrens und die damit verbundene Bestimmung von APC äußerst hilfreich sein.

Bei dem unter Punkt 3.16 beschriebenen Versuch wurde angestrebt, zuerst die Bildung von endogenem APC zu fördern und anschließend den Anstieg von APC unter Verwendung die-

ses Assays zu quantifizieren. Durch Zugabe prokoagulatorischer Substanzen, CaCl_2 sowie einer Mischung aus Phospholipiden und rekombinantem tissue factor, konnte die Gerinnungskaskade in Citratplasma ausgelöst und auf diese Weise die Bildung von APC gefördert werden. Zur verstärkten Aktivierung von Protein C wurde zusätzlich 100 $\mu\text{g/ml}$ Thrombomodulin beigefügt. Die weitere Fibrinpolymerisation wurde unter Verwendung eines Inhibitors gehemmt. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Hirudin.

Ziel des Versuches war es, physiologische Vorgänge zu imitieren, um so beweisen zu können, dass mit Hilfe des Assays eine direkte Bestimmung der APC-Plasmakonzentration möglich ist. Es konnte innerhalb von zehn Minuten ein Anstieg des APC-Gehalts von 0,06 ng/ml auf 7,75 ng/ml gemessen werden. Zur Bestätigung, dass Gerinnungsvorgänge stattgefunden haben, wurden sowohl die Thrombin-Antithrombin-Komplexe als auch die Prothrombinfragmente bestimmt. Deren nachweisbarer Anstieg beweist, dass mit Hilfe von CaCl_2 und PPP-Reagenz, einer Mischung aus Phospholipiden und rekombinantem tissue factor, die Gerinnung erfolgreich aktiviert werden konnte. Aufgrund der Anwesenheit dieser Reagenzien konnte die Gerinnung über den exogenen Weg ausgelöst werden, was die Bildung von Thrombin nach sich zog. Ferner führte die Zugabe von TM zur Bildung von Thrombin-Thrombomodulinkomplexen. Die darauf normalerweise folgende Fibrinpolymerisation wurde mit dem Hinzufügen eines Fibrinpolymerisation-Inhibitors unterbunden. Infolge einer verstärkten Bildung von APC müsste es zu einer gleichzeitigen Abnahme des Zymogengehalts kommen. Wie sich bei der Konzentrationsbestimmung des PC-Antigens mit Hilfe eines PC-spezifischen ELISA-Tests jedoch herausstellte, ließ sich keine signifikante Reduktion des PC-Spiegels feststellen. Die Bestimmung von PC ist nicht sensitiv genug, um die direkte Korrelation zwischen dem Abfall der PC-Konzentration und dem damit einhergehenden Anstieg der APC-Konzentration verdeutlichen zu können. Diese Tatsache lässt sich mit dem enormen quantitativen PC-Überschuss erklären. Die Plasmakonzentration von PC ist etwa 1.000mal höher als die von APC; folglich bedingt eine Zunahme der APC-Plasmakonzentration nur eine vergleichsweise geringe Minderung der PC-Konzentration (*Müller et al., 2009*).

Anhand dieser Ergebnisse konnte der Beweis erbracht werden, dass es – wie auch andere Studien schon zeigten – beim Ablauf von Gerinnungsvorgängen zu einem Anstieg des APC-Gehalts im Plasma kommt (*Dahlbäck et al, 2005*). Mit Hilfe des Testverfahrens kann diese Zunahme nun exakt und zuverlässig quantifiziert werden.

4.13 Problematik und Ursache des überschießenden Substratumsatzes

Im Laufe der Entwicklung dieses Assays stellte sich heraus, dass einzelne Messwerte durch überschießenden Substratumsatz gekennzeichnet waren. Diese scheinbar in keiner Relation zur tatsächlichen APC-Konzentration stehenden Messergebnisse sorgten für Ungenauigkeiten im Testverfahren. Mit den vorliegenden Ergebnissen stellte sich die Frage nach der Ursache für die einzelnen Messungenauigkeiten. Von besonderem Interesse war, ob die Werte aufgrund einer erhöhten Hydrolyserate des Substrates entstanden sind und inwiefern ein Zusammenhang mit der Beschichtung der wells bestand.

Wie das unter Punkt 3.18 dargestellte Resultat veranschaulicht, kam es sowohl im Hirudin- als auch im Citratplasma vereinzelt zu falsch hohen Messwerten, und dies nicht nur in den Versuchsansätzen mit zuvor hinzugegebenem APC, sondern auch in den Plasmaleerwerten. Zunächst konnte, wie anhand des Versuches unter Punkt 3.19 verdeutlicht, gezeigt werden, dass die überschießenden Messwerte nach erneuter Messung unter Verwendung der gleichen Mikrotiterplatte reproduzierbar waren und deshalb am wenigsten auf zufällige Messfehler des ELISA-Prozessors zurückzuführen sind. So konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vorliegenden Messergebnissen um Zufallsbefunde handelt. Unter Verwendung von Pefablock, einem irreversiblen Breitband-Inhibitor für Serinproteasen, gelang es, jeglichen Substratumsatz effektiv zu unterdrücken. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei den einzelnen Ausreißern um Messwerte handelt, die aufgrund einer gewissen Enzymaktivität entstehen. In einem einzigen well wurde allerdings auch nach Zugabe des Protease-Inhibitors ein erhöhtes Messergebnis beobachtet. Es ist vorstellbar, dass diese Tatsache auf eine Verunreinigung des wells zurückzuführen ist. Letztendlich ist auch eine restliche Enzymaktivität nicht völlig auszuschließen; die vorliegenden Daten sprechen allerdings dagegen.

Um eine möglichst exakte und zuverlässige Bestimmung der APC-Konzentration im Plasma zu gewährleisten und die Anzahl der Ausreißer auf ein Minimum beschränken zu können, wurde der Einfluss von Hirudin im Substratpuffer (Endkonzentration: 10 µg/ml) untersucht. Wie anhand der Ergebnisse deutlich wurde, führte die Zugabe von Hirudin in den Substratpuffer zu einer verstärkten Ungenauigkeit der Messergebnisse, weshalb dies nicht als mögliche Methode zur Reduzierung der Ausreißer infrage kam. Die Ursache für die Ausreißer schienen also Enzyme zu sein, die unspezifisch in den wells binden und folglich für eine erhöhte Hydrolyserate des Substrates verantwortlich waren. Für diese Hypothese spricht zudem die bereits erwähnte mögliche Blockade der Enzymaktivität durch den Protease-Inhibitor.

Zur Ermittlung der Ursache der unspezifischen Enzymbindung wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Wie die Resultate unter Punkt 3.21 verdeutlichen, kam es ohne Streptavidinbeschichtung der einzelnen wells nicht zu überschießenden Substratumsätzen. Wurde die Mikrotiterplatte jedoch mit Streptavidin inkubiert, stieg die Rate der Ausreißer signifikant an. Eine zusätzliche, im Versuchsablauf vorgesehene Beschichtung der wells mit Aptameren führte zwar zu keiner weiteren Zunahme der Messungengenauigkeit, dafür ließ sich jedoch ein Anstieg des Grundumsatzes feststellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die einzelnen Ausreißer infolge einer unspezifischen Enzymbindung an Streptavidin verursacht werden.

Streptavidin wurde ursprünglich aus Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* hergestellt. Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen (*Holmberg et al., 2005*). Der Vorteil von Streptavidin gegenüber Avidin ist, dass unspezifische Bindungen im Streptavidin-System seltener zu beobachten sind, was damit zusammenhängt, dass Streptavidin nicht an Kohlenhydratrezeptoren bindet (*Laitinen et al., 2006*). Die Vermutung scheint jedoch plausibel, dass es während des Testverfahrens zu einer bakteriellen Kontamination des Streptavidins kommt, was sich in einer erhöhten Hydrolyserate des flourogenen Substrats widerspiegelt. Als problematisch bei der Behebung dieser Tatsache erwies sich, dass die Beschichtung der wells mit Streptavidin essentiell für das Testverfahren ist und somit als Fehlerquelle nicht einfach eliminiert werden konnte. Diese Problematik könnte mit dem Einsatz von Mikrotiterplatten, an denen eine kovalente Bindung der Aptamere ermöglicht werden würde, umgangen werden. Diese Bindung wäre durch eine 5'-Phosphorylierung des HS-02 Aptamers sowie durch die Verwendung von CovaLink-Mikrotiterplatten (Nunc™) realisierbar. Schwachstelle dieses Testsystems wäre hingegen, dass die benötigte Menge an Aptameren wesentlich höher sein müsste und folglich der Materialverbrauch steigen würde. Darüber hinaus ließe sich die Aptamerkonzentration nicht so schnell variieren, wie dies unter Verwendung von Streptavidin der Fall ist.

Letzendlich bestätigt diese Problematik, mit der sich weitere Untersuchungen befassen werden müssen, die Komplexität des Testverfahrens. Dessen ungeachtet ist es möglich, unter Zuhilfenahme dieses Assays APC-Konzentrationen im Plasma zuverlässig und innerhalb kurzer Zeit exakt bestimmen zu können. Durch Mehrfachmessungen können Ausreißer identifiziert werden, die als Folge einer unspezifischen Enzymaktivierung im Streptavidin-gecoateten well auftreten können.

5 Zusammenfassung

Das Protein-C-System ist ein antikoagulatorisch (gerinnungshemmend) wirkendes Enzymsystem. Schlüsselenzym dieses Systems ist das aktivierte Protein C (APC), eine Serinprotease, die an der Endothelzelloberfläche aus seinem Zymogen Protein C (PC) generiert wird (*Dahlbäck und Vil-loutreix, 2005; Esmon, 2003*). Die Bildung von APC verläuft in zwei Schritten. Zunächst kommt es zur Bindung von PC an den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR), gefolgt von der proteolytischen Aktivierung durch Thrombin-Thrombomodulin-Komplexe (*Liaw et al., 2001*). Neben seinen antikoagulatorischen Eigenschaften weist APC zytoprotektive, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Effekte auf (*Griffin et al., 2007*). Trotz der enormen physiologischen und pathophysiologischen Relevanz von APC gibt es bisher kein zuverlässiges Testverfahren, mit dem die endogene APC-Konzentration schnell und exakt quantifiziert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Aufbau und Validierung eines oligonucleotide assay zum Nachweis von aktiviertem Protein C beschrieben werden. Mit der Entwicklung des DNA-Aptamers HS02, das mit einer Affinität von $K_D = 0,5 \text{ nM}$ an APC bindet und signifikant zwischen APC und seinem Zymogen diskriminieren kann, steht ein vielversprechender Kandidat zur Entwicklung eines sensitiven und selektiven Testverfahrens zur Verfügung. Die Bestimmung der APC-Konzentration im Plasma fand im Mikrotiterplattenformat statt. Nach der Beschichtung der wells mit Streptavidin wurden die Aptamere, die beim Herstellungsprozess an ihrem 3'-Ende an Biotin gekoppelt wurden, in den einzelnen wells für 60 Minuten inkubiert, sodass bei der anschließenden Zugabe von Plasma die Voraussetzung der Bindungsmöglichkeit zwischen den Aptameren und dem sich im Plasma befindenden APC gegeben war. Die Bestimmung der APC-Konzentration erfolgte anhand der Messung der amidolytischen Aktivität von APC unter Zuhilfenahme eines flourogenen Substrats. Die Flouoreszenzemission wurde mittels eines automatischen ELISA-Prozessors in einem Zeitraum von 180 Minuten alle 5 Minuten gemessen. Zur Verhinderung einer irreversible Hemmung des APC durch im Plasma befindliche Serpinen wurde das Plasma mit Aprotinin ($20\mu\text{M}$), einem äußerst starken, reversiblen Serinprotease-Inhibitor, versetzt. Um ein sensitives und hochspezifisches Testverfahren entwickeln zu können, mussten verschiedenste Einflussfaktoren und Störgrößen systematisch untersucht werden. Basierend auf den Versuchsergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass die Aptamere – zumindest in der eingesetzten Methodik – resistent gegen körpereigene DNAsen sind. Basierend auf den durchgeführten Versuchen wurde der Beweis erbracht, dass, im Gegensatz zu bisher entwickelten Testverfahren,

die Sensitivität dieses Assays in unverdünntem Plasma am höchsten war. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Plasmahalbwertszeit von APC bei Raumtemperatur 25 Minuten beträgt, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt (*Gruber und Griffin, 2002; Orthner et al., 1993*). Basierend auf einer gemessenen APC-Konzentration von $0,049 \text{ ng/ml} \pm 0,005$ in gepooltem Citratplasma lässt sich schlussfolgern, dass in-vivo eine kontinuierliche Aktivierung des PC stattfindet und infolgedessen APC als eine natürliche Plasmakomponente anzusehen ist. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Klärung der Fragestellung war der Nachweis, dass Protein C-Konzentrationen zwischen 0 % und 200 % der physiologischen Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Bestimmung der APC-Konzentration haben.

Sowohl die Verwendung von rekombinant hergestelltem APC zur Therapie einer schweren Sepsis als auch die zytoprotektiven, anti-inflammatorischen und anti-apoptischen Eigenschaften von APC sind in Bezug auf die exakte Kenntnis der Plasmakonzentration von erheblichem Nutzen. Dank des in dieser Arbeit vorgestellten Messverfahrens besteht nun die Möglichkeit der genauen und zuverlässigen Bestimmung der APC-Plasmakonzentration. Mit diesem Nachweis konnte der Grundstein für die Etablierung eines derartigen Testverfahrens im Klinikalltag gelegt werden. Hierzu müssen jedoch noch einige weitere Studien durchgeführt werden. Gegenstand dieser Untersuchungen wird sicherlich zum einen die Bestimmung der APC-Konzentration in verschiedenen Krankheitszuständen und zum anderen auch die Bedeutung dieser Konzentration in Bezug auf die Prognose der Krankheitszustände und die weiterführenden diagnostischen Maßnahmen sein.

6 Summary

The blood clotting process is carefully controlled by several anticoagulant principles, which under normal conditions balance procoagulant forces in order to avoid overcoagulation with the risk of thrombus formation. An important natural anticoagulant is the protein-C-pathway with its key enzyme activated protein C (APC), a serine protease that is generated from its zymogen protein C (PC) on the surface of endothelial cells (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005; Esmon, 2003*). The formation of APC is a two-step process. First it requires binding of PC to the endothelial cell protein C receptor (EPCR) followed by proteolytic activation through thrombin/thrombomodulin complexes (*Liaw et al., 2001*). In addition to its anticoagulant functions APC shows cytoprotective effects including anti-inflammatory and anti-apoptotic activities (*Griffin et al., 2007*). Despite its enormous physiological and pathophysiological importance, there exists no reliable assay that permits the rapid and exact detection of plasma APC.

The generation and characterization of an oligonucleotide assay for the detection of APC is described within the scope of this study. With the identification of the aptamer HS02 that binds to APC with high affinity and a remarkable specificity but shows selectivity against the proenzym PC, a promising candidate was found for the development of a rapid APC-specific assay, applicable for daily clinical practice. The measurement of the APC plasma levels was realized in 96-well microtiter plates. To secure binding of the aptamers, which were 3'-biotinylated, the wells were first coated with streptavidin. Addition of plasma and incubation time of 120 min made the formation of aptamer-APC complexes possible. To study the amount of APC in plasma, the amidolytic activity of the immobilized APC toward a peptide fluorogenic substrate was measured. The hydrolysis of the substrate was monitored at a dual wavelength setting of 360/460 nm over 180 min and recorded using a microplate autoreader. To avoid irreversible inhibition of APC by plasma enzymes, plasma samples were spiked with aprotinin (20 μ M), a reversible serin protease inhibitor. For the development of a highly specific and reliable test system, useful in monitoring the APC plasma levels, several questions had to be answered. As the results of the experiments show, the HS02 aptamer is resistant to endogenous DNAses. In contrast to previous testing methods it could be proved that this assay reaches its greatest sensitivity in undiluted plasma due to the aptamer's high degree of specificity toward APC. Furthermore, it could be demonstrated that the half-life of APC is 25 min (room temperature), which corresponds to the results of other studies. The demonstration of APC plasma levels of $0,049 \pm 0,005$ ng/ml in citrated pooled plasma

provides direct evidence for the continuous in vivo activation of the anticoagulant PC pathway and for circulating APC as a normal plasma component (*Gruber und Griffin, 2002; Orthner et al., 1993*).

As mentioned previously, APC is an antithrombotic agent that was successfully used in humans with severe sepsis and shows cytoprotective, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. Thus, a direct assay for circulating APC and the laboratory diagnosis of APC deficiency in patients would be very useful. Therefore, the availability of a sensitive and simple assay for quantifying circulating APC seems to be very important. The test system described herein permits the direct detection of APC and might be useful for the establishment of a daily clinical setting. Because the physiologic significance of circulating APC remains to be established, further clinical studies are required in order to find out whether measuring APC levels in normal or various disease states will have prognostic or diagnostic value.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Deckblatt: Ein Modell der Kristallstruktur von APC basierend auf der 1AUT-Struktur aus der Protein Data Bank. Die Seitenketten der basischen Anteile des 39-loop, 60-loop und des 70-80-loop, welche die basische Exosite bilden, sind rot markiert, während die sauren Anteile des 162-Helix in blauer Farbe dargestellt sind. Die katalytische Triade im Zentrum des Moleküls ist in grüner Farbe dargestellt.

8 Literaturverzeichnis

Andrews RK, Berndt MC.

Adhesion-dependent signalling and the initiation of haemostasis and thrombosis.

Histol Histopathol. 1998; 13: 837-844

Anglés-Cano E.

Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces.

Chem Phys Lipids. 1994; 67-68: 353-362

Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR.

Haemostasis.

Handb Exp Pharmacol. 2006; 176 (Pt 2): 1-41

Autin L, Steen M, Dahlbäck B, Villoutreix BO.

Proposed structural models of the prothrombinase (FXa-FVa) complex.

Proteins. 2006; 63: 440-450

Aznar J, España F, Estellés A, Royo M.

Heparin stimulation of the inhibition of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor--influence of the molecular weight of heparin and ionic strength.

Thromb Haemost. 1996; 76: 983-988

Baldrich E, Restrepo A, O'Sullivan CK.

Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance.

Anal Chem. 2004; 76: 7053-7063

Bandyopadhyay PK.

Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification.

Vitam Horm. 2008; 78: 157-184

Baratto F, Michielan F, Meroni M, Dal Palù A, Boscolo A, Ori C.

Protein C concentrate to restore physiological values in adult septic patients.

Intensive Care Med. 2008; 34: 1707-1712

Barthels M, Kempkes-Matthes B, Pötzsch B, Preissner KT, Riess H.

Hemostasis and thrombosis research—an intensive course in clinical hemostasis.

Hamostaseologie. 2008; 28: 255-256

Baruch D.

Platelet--vessel wall interactions.

Therapie. 2006; 61: 371-378

Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S.

Endothelial function and hemostasis.

Z Kardiol. 2000; 89: 160-167

Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD.

Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice.

Thromb Haemost. 2008; 99: 264-270

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr.

Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.

N Engl J Med. 2001; 344: 699-709

Berntorp E.

Prophylaxis and treatment of bleeding complications in von Willebrand disease type 3.

Semin Thromb Hemost. 2006; 32: 621-625

Blajchman MA.

An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1994; 5 Suppl 1: 5-11

Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H.

Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen.

J Biol Chem. 2001; 276: 16464-16468

Blind M, Kolanus W, Famulok M.

Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade.

Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 3606-3610

Blind M, Grättinger M, Mayer G.

Nucleic acid biotools: accelerating the discovery of lead compounds.

Screening 2002; 6: 35-37

Bozza M, Sheardy RD, Dilone E, Scypinski S, Galazka M.

Characterization of the secondary structure and stability of an RNA aptamer that binds vascular endothelial growth factor.

Biochemistry. 2006; 45: 7639-7643

Brody EN, Willis MC, Smith JD, Jayasena S, Zichi D, Gold L.

The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics.

Mol Diagn. 1999; 4: 381-388

Buerger C, Groner B.

Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling.

J Cancer Res Clin Oncol. 2003; 129: 669-675

Burgstaller P, Girod A, Blind M.

Aptamers as tools for target prioritization and lead identification.

Drug Discov Today. 2002; 7: 1221-1228

Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C, Keefe AD.

Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF.

Chem Biol. 2005; 12: 25-33

Chen VM, Hogg PJ.

Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis.

J Thromb Haemost. 2006; 4: 2533-2541

Chen CY, Lu SC, Liao TH.

The distinctive functions of the two structural calcium atoms in bovine pancreatic deoxyribonuclease.

Protein Sci. 2002; 11: 659-668

Chu TC, Marks JW 3rd, Lavery LA, Faulkner S, Rosenblum MG, Ellington AD, Levy M.

Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells.

Cancer Res. 2006; 66: 5989-5992

Cooper PC, Rezende SM.

An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations.

Int J Lab Hematol. 2007; 29: 153-162

Crawley JT, Lane DA.

The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28: 233-242

Dahlbäck B, Villoutreix BO.

The anticouglant protein C pathway.

FEBS Letters 579 2005; 3310-3316

Dahlbäck B, Villoutreix BO.

Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticouglant Pathway:

Novel Insight Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005; 25: 1311-1320

Davie E, Kulman J.

An Overview of the Structure and Function of Thrombin.

Seminars in Thromb and Heamost 2006; 32: 3-15

Dempfle CE.

The TAFI system. The new role of fibrinolysis.

Hamostaseologie. 2007; 27: 278-281

De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G.
Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications.
Semin Thromb Hemost. 1998; 24: 367-379

Dhainaut JF, Yan SB, Claessens YE.
Protein C/activated protein C pathway: overview of clinical trial results in severe sepsis.
Crit Care Med. 2004; 32: 194-201

Dollins CM, Nair S, Sullenger BA.
Aptamers in immunotherapy.
Hum. Gene Ther 2008; 19: 443-450

Ellington AD, Szostak JW.
In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.
Nature. 1990; 346: 818-822

Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M.
A new cause of familial thrombophilia: resistance to the effect of activated protein C.
Presse Med. 1994; 23: 1285-1287

Esmon CT.
Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling thrombosis and inflammation.
Crit Care Med 2001; 29: 48-52

Esmon CT.
The protein C pathway.
Chest. 2003; 124: 26-32

Esmon CT.
Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor.
Crit Care Med. 2004; 32: 298-301

Esmon CT, Liaw PCY, Ferrell GL.
Assay for rapid detection of human activated protein C and highly specific monoclonal antibody
therefore.
World Patent WO/2002/029015

España F, Medina P, Navarro S, Estellés A, Aznar J.
Inherited abnormalities in the protein C activation pathway.
Pathophysiol Haemost Thromb. 2002; 32: 241-244

Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J.
The multifunctional protein C system.
Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents. 2005; 3: 119-131

Espana F, Aznar J.

Quantification of Circulating Activated Protein C in Human Plasma by Immunoassays- Enzym Levels are Proportional to Total Protein C Levels.

Thromb and Heamost 1996; 75: 56-61

Eyetech Study Group.

Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration.

Retina. 2002; 22: 143-152

Famulok M, Hartig JS, Mayer G.

Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy.

Chem Rev. 2007; 107: 3715-3743

Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran TN, Lavan DA, Langer R.

Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells.

Cancer Res. 2004; 64: 7668-7672

Franchini M, Tagliaferri A, Mannucci PM.

The management of hemophilia in elderly patients.

Clin Interv Aging. 2007; 2: 361-368

Federici AB, Mannucci PM.

Management of inherited von Willebrand disease in 2007.

Ann Med. 2007; 39: 346-358

Ferreira CS, Matthews CS, Missailidis S.

DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers.

Tumour Biol. 2006; 27: 289-301

Fisher CJ Jr, Yan SB.

Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases.

Crit Care Med. 2000; 28: 49-56

Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D.

Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease.

Int J Hematol. 2002; 75: 9-18

Fukudome K, Esmon CT.

Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor.

J Biol Chem. 1994; 269: 26486-26491

Gal SW, Amontov S, Urvil PT, Vishnuvardhan D, Nishikawa F, Kumar PK, Nishikawa S.

Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function.

Eur J Biochem. 1998; 252: 553-562

- Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M.
RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity.
Nucleic Acids Res. 1996; 24: 1029-1036
- George JN, Shattil SJ.
The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function.
N Engl J Med. 1991; 324: 27-39
- Gerlach E, Becker BF.
Interaction of blood and the vascular wall: hemostatic aspects.
Z Kardiol. 1993; 82: 13-21
- Gill JC.
Treatment of urgent bleeding in von Willebrand disease.
Thromb Res. 2007; 120: 21-25
- Girolami A, Scandellari R, Scapin M, Vettore S.
Congenital bleeding disorders of the vitamin K-dependent clotting factors.
Vitam Horm. 2008; 78: 281-374
- Glasscock LN, Gerlitz B, Cooper ST, Grinnell BW, Church FC.
Basic residues in the 37-loop of activated protein C modulate inhibition by protein C inhibitor but not by alpha(1)-antitrypsin.
Biochim Biophys Acta. 2003; 1649: 106-117
- Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M.
Diversity of oligonucleotide functions.
Annu Rev Biochem. 1995; 64: 763-797
- Golino P, Forte L, De Rosa S.
Inhibition of the tissue factor coagulation pathway.
Curr Vasc Pharmacol. 2004; 2: 319-327
- Greinacher A, Warkentin TE.
The direct thrombin inhibitor hirudin.
Thromb Haemost. 2008; 99: 819-829
- Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO.
Activated protein C.
J Thromb Haemost. 2007; 5: 73-80
- Griffin JH, Zlokovic B, Fernández JA.
Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke.
Semin Hematol. 2002; 39: 197-205

- Grinnell BW, Joyce D.
Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis.
Crit Care Med. 2001; 29: 53-61
- Gruber A, Griffin JH.
Direct Detection of Activated Protein C in Blood From Human Subjects.
Blood 1992; 79: 2340-2348
- Harenberg J, Fenyvesi T.
Heparin, thrombin and Factor Xa inhibitors.
Hamostaseologie. 2004; 24: 261-278
- Heckel A, Buff M, Raddatz S, Müller J, Pötzsch B, Mayer G.
An Anticoagulant with Light-Triggered Antidote Activity.
Angew. Chem. Int. Ed. 2006; 45: 1-4
- Heeb MJ, Mosher D, Griffin JH.
Activation and complexation of protein C and cleavage and decrease of protein S in plasma of patients with intravascular coagulation.
Blood 1989; 73: 455-461
- Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH.
Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin.
J Biol Chem. 1991; 266: 17606-17612
- Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlén M.
The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures.
Electrophoresis. 2005; 26: 501-510
- Huntington JA.
Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis.
J Thromb Haemost. 2003; 1: 1535-1549
- Jackson CJ, Xue M.
Activated protein C--an anticoagulant that does more than stop clots.
Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40: 2692-2697
- James W.
Aptamers in the virologists' toolkit.
J Gen Virol. 2007; 88: 351-364
- Jaques LB.
The new understanding of the drug heparin.
Chest. 1985; 88: 751-754

Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjić N.

Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*. 1994; 33: 10450-10456

Jeter ML, Ly LV, Fortenberry YM, Whinna HC, White RR, Rusconi CP, Sullenger BA, Church FC.

RNA aptamer to thrombin binds anion-binding exosite-2 and alters protease inhibition by heparin-binding serpins.

FEBS Lett. 2004; 568: 10-14

Johne J, Blume C, Benz PM, Pozgajová M, Ullrich M, Schuh K, Nieswandt B, Walter U, Renné T.

Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma.

Biol Chem. 2006; 387: 173-178

Kehrel BE.

Blutplättchen *Biochemie und Physiologie*.

Hämostasiologie 2003; 23: 149–158

Kunamneni A, Ravuri BD, Saisha V, Ellaiah P, Prabhakar T.

Urokinase-a very popular cardiovascular agent.

Recent Patents Cardiovasc Drug Discov. 2008; 3: 45-58

Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR, Kulomaa MS.

Genetically engineered avidins and streptavidins.

Cell Mol Life Sci. 2006; 63: 2992-3017

Laterre PF.

Clinical trials in severe sepsis with drotrecogin alfa (activated).

Crit Care. 2007; 11: 5

Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP.

Fibrin structure and wound healing.

J Thromb Haemost. 2006; 4: 932-939

Levi M.

Activated protein C in sepsis: a critical review.

Curr. Opin. Hematol. 2008; 15: 481-486

Levi M, de Jonge E, van der Poll T.

New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology.

Ann Med. 2004; 36: 41-49

Liaw PC.

Endogenous protein C activation in patients with severe sepsis.

Crit Care Med. 2004; 32: 214-218

Liaw PCY, Ferrel G, Esmon CT.

A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation.

Journal of Thrombosis and Hemostasis 2003; 1: 662-670

Liaw PCY, Mather T, Organesyan N, Ferrel GL, Esmon CT.

Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein c receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class I-type receptor.

J. Biol. Chem. 2001; 276: 8364-8370

Liu FY, He SL.

Revision of the biological significance of the contact system.

Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2000; 31: 7-12

Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS.

Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen.

Cancer Res. 2002; 62: 4029-4033

Lwaleed BA, Bass PS.

Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease.

J Pathol. 2006; 208: 327-339

Mackman N, Tilley RE, Key NS.

Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 1687-1693

Mannironi C, Di Nardo A, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP.

In vitro selection of dopamine RNA ligands.

Biochemistry. 1997; 36: 9726-9734

Markwardt F.

Hirudin as alternative anticoagulant--a historical review.

Semin Thromb Hemost. 2002; 28: 405-414

Marlar RA, Neumann A.

Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies.

Semin Thromb Hemost. 1990; 16: 299-309

Marlar RA, Mastovich S.

Hereditary protein C deficiency: a review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1990; 1: 319-330

Mayer G, Famulok M.

Nucleic acids in the drug discovery process: aptamers as therapeutic and as active ingredients for drugs.

Pharm Unserer Zeit. 2007; 36: 432-436

McVey JH.

Tissue factor pathway.

Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 1999; 12: 361-72

Merli GJ, Fink J.

Vitamin K and thrombosis.

Vitam Horm. 2008; 78: 265-79

Michaud M, Jourdan E, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E.

A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC.

J Am Chem Soc. 2003; 125: 8672-8679

Montiel-Manzano G, de la Peña-Díaz A, Majluf-Cruz A, Cesarman-Maus G, Corona-de la Peña N, Cruz-Cruz D, Gaminio E, Martínez-Murillo C, Mayagoitia T, Miranda-Peralta E, Poblete T, Quintana-Martínez S, Ramírez R, Razo D, Ruiz de Chávez-Ochoa A, Reyes-Núñez VA, Salazar R, Vicencio-Santiago GV, Villa R.

National evaluation of the diagnosis of activated protein C resistance.

Rev Invest Clin. 2003; 55: 358-369

Mosesson MW.

Fibrinogen and fibrin structure and functions.

J Thromb Haemost. 2005; 3: 1894-1904

Müller J, Wullfen B, Pöttsch B, Mayer G.

Multi-domain targeting generates a high affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer.

Chembiochem. 2007; 8: 2223-2236

Müller J, Iserman B, Dücker I, Salehi M, Meyer M, Friedrich M, Madhusdhan M, Oldenburg J, Mayer G, Pöttsch B.

An exosite-specific ssDNA aptamer inhibits the anticoagulant functions of activated protein C and alters protease inhibition by protein C inhibitor in a glycosaminoglycan-like fashion.

Chem Biol. 2009; 16: 442-451

Mureebe L.

Direct thrombin inhibitors: alternatives to heparin.

Vascular. 2007; 15: 372-375

Nesheim M.

Thrombin and fibrinolysis.

Chest. 2003; 124: 33-39

Nesheim M, Walker J, Wang W, Boffa M, Horrevoets A, Bajzar L.
Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation.
Ann N Y Acad Sci. 2001; 936: 247-260

Nieuwlandt D, Wecker M, Gold L.
In vitro selection of RNA ligands to substance P.
Biochemistry. 1995; 34: 5651-5659

Norris LA.
Blood coagulation.
Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2003; 17: 369-383

Nutescu EA, Shapiro NL, Chevalier A.
New anticoagulant agents: direct thrombin inhibitors.
Cardiol Clin. 2008; 26: 169-187

Nystedt S, Ramakrishnan V, Sundelin J.
The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor.
J Biol Chem. 1996; 271: 14910-14915

Okajima K, Koga S, Kaji M, Inoue M, Nakagaki T, Funatsu A, Okabe H, Takatsuki K, Aoki N.
Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects.
Thromb Haemost. 1990; 63: 48-53

Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M.
The vitamin K cycle.
Vitam Horm. 2008; 78: 5-62

Patel S, Berry LR, Chan AK.
Covalent antithrombin-heparin complexes.
Thromb Res. 2007; 120: 151-160

Opal SM.
Interactions between coagulation and inflammation.
Scand J Infect Dis. 2003; 35: 545-554

Orthner CL, Kolen B, Drohan WN.
A sensitive and facile assay for the measurement of activated protein C activity levels in vivo.
Thromb Haemost. 1993; 69: 441-447

Peake I, Goodeve A.
Type 1 von Willebrand disease.
J Thromb Haemost. 2007; 5: 7-11

Petach H, Gold L.
Dimensionality is the issue: use of photoaptamers in protein microarrays.
Curr Opin Biotechnol. 2002; 13: 309-314

Peters RJ, Moons AH, Büller HR.
Thrombocyte receptors: current views and therapeutic options.
Ned Tijdschr Geneeskd. 1999; 143: 1952-1957

Pipe SW, Valentino LA.
Optimizing outcomes for patients with severe haemophilia A.
Haemophilia. 2007; 13: 1-16

Pötzsch B, Witt I, Dörner K, Madlener K.
Hämostasologie.
In: Dörner K, Hrsg.; *Klinische Chemie und Hämatologie*
Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2006: 280-314

Pötzsch B, Witt I.
APC (activated protein C) resistance
Hamostaseologie. 2002; 22: 25-28

Pötzsch B, Madlener K.
Primäre hämorrhagische Diathesen.
Last but not least: Physiologie
In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Gerinnungskonsil*
Stuttgart- New York: Thieme, 2002; 18-49: 212-224

Price GC, Thompson SA, Kam PC.
Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor.
Anaesthesia. 2004; 59: 483-492

Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A.
Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications.
Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 69: 367-374

Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN.
Antithrombin: in control of coagulation.
Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36: 386-389

Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC.
Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis.
J Thromb Haemost. 2007; 5: 102-115

Reiner AP, Bell WR.
The fibrinolytic system in man.
Crit Rev Oncol Hematol. 1984; 2: 33-81

Rezaie AR.

Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway.

Trends Cardiovasc Med. 2003; 13: 8-15

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W.

Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway.

Science. 2002; 296: 1880-1882

Rojkjaer LP, Rojkjaer R.

Clot stabilization for the prevention of bleeding.

Hematol Oncol Clin North Am. 2007; 21: 25-32

Romig TS, Bell C, Drolet DW.

Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999; 731: 275-284

Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS.

Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and co-factor function.

J Biol Chem. 1991; 266: 16256

Ruggeri ZM.

Inhibition of platelet-vessel wall interaction. Platelet receptors, monoclonal antibodies, and synthetic peptides.

Circulation. 1990; 81: 35-41

Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G Jr, Scardino E, Fay WP, Sullenger BA.

Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo.

Nat Biotechnol. 2004; 22: 1423-1428

Salehi M.

Funktionelle Charakterisierung von aktiviertem Protein C erkennenden DNA-Aptameren

Diplomarbeit. 2007

Schellongowski P, Bauer E, Holzinger U, Staudinger T, Frass M, Laczika K, Locker GJ, Quehenberger P, Rabitsch W, Schenk P, Knöbl P.

Treatment of adult patients with sepsis-induced coagulopathy and purpura fulminans using a plasma-derived protein C concentrate (Ceprotin).

Vox Sang. 2006; 90: 294-301

Schmaier AH, McCrae KR.

The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation.

J Thromb Haemost. 2007; 5: 2323-2329

Schmidt-Supprian M, Murphy C, While B, Lawler M, Kapurniotu A, Voelter W, Smith O, Bernhagen J.

Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes.

Eur Cytokine Netw. 2000; 11: 407-413

Schneppenheim R, Barthels M, Budde U.

Inborn and acquired von Willebrand disease.

Hamostaseologie. 2005; 25: 367-375

Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GA.

Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms.

Thromb Haemost. 2007; 98: 530-542

Shaw DM.

Factor V Leiden: an overview.

Clin Lab Sci. 2006; 19: 218-221

Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ.

Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity.

J Biol Chem. 1989; 264: 17049-17057

Spiel AO, Firbas C, Mayr FB, Leitner JM, Schmidt B, Knöbl P, Varadi K, Jilma B.

The effects of supra-normal protein C levels on markers of coagulation, fibrinolysis and inflammation in a human model of endotoxemia.

Thromb Haemost. 2005; 94: 1148-1155

Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H.

The hemostatic system.

Curr Med Chem. 2004; 11: 2245-2260

Steinhubl SR, Moliterno DJ.

The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis.

Am J Cardiovasc Drugs. 2005; 5: 399-408

Stull RA, Szoka FC Jr.

Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects.

Pharm Res. 1995; 12: 465-483

Swanson JM.

Heparin-induced thrombocytopenia: a general review.

J Infus Nurs. 2007; 30: 232-240

Tabernero D, España F, Vicente V, Estellés A, Gilabert J, Aznar J.

Protein C inhibitor and other components of the protein C pathway in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment.

Thromb Haemost. 1990; 63: 380-382

Taby O, Chabbat J, Steinbuch M.

Inhibition of activated protein C by aprotinin and the use of the insolubilized inhibitor for its purification.

Thromb Res. 1990; 59: 27-35

Takagi M, Wada H, Mukai K, Minamikawa K, Wakita Y, Deguchi K, Junji N, Hayashi T, Suzuki K, Shiku H.

Increased activated protein C: protein C inhibitor complex and decreased protein C inhibitor levels in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis.

Clin Appl Thromb Hemost. 1999; 5: 113-116

Tanaka KA, Szlam F, Levy JH.

The effect of aprotinin on activated protein C-mediated downregulation of endogenous thrombin generation.

Br J Haematol. 2006; 134: 77-82

Taylor FB Jr, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE.

Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon.

J Clin Invest. 1987; 79: 918-925

Taylor F, Chang A, Ferrell G, Mather T, Catlett R, Blick K, Esmon CT.

C4b-binding protein exacerbates the host response to Escherichia coli.

Blood. 1991; 78: 357-363

Terada H.

Hemophilia--present and past.

Nippon Rinsho. 2008; 66: 591-599

Thomas S.

Platelet membrane glycoproteins in haemostasis.

Clin Lab. 2002; 48: 247-262

Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B.

Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V.

Blood. 1999; 93: 2552-2558

Toltl LJ, Swystun LL, Pepler L, Liaw PC.

Protective effects of activated protein C in sepsis.

Thromb Haemost. 2008; 100: 582-592

Tuerk C, Gold L.

Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.

Science. 1990; 249: 505-510

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B.

Cell adhesion mechanisms in platelets.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28: 403-412

Verhamme P, Hoylaerts MF.

The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis.

Acta Clin Belg. 2006; 61: 213-219

Verstraeten L, François P, Dinant JP.

The physiology of primary hemostasis.

J Pharm Belg. 1989; 44: 302-307

Wada H, Sakuragawa N.

Are fibrin-related markers useful for the diagnosis of thrombosis?

Semin Thromb Hemost. 2008; 34: 33-38

Walter U, Geiger J, Haffner C, Markert T, Nehls C, Silber RE, Schanzenbächer P.

Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors.

Agents Actions Suppl. 1995; 45: 255-268

Warkentin TE.

Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin.

Best Pract Res Clin Haematol. 2004; 17: 105-125

Warkentin TE, Greinacher A, Craven S, Dewar L, Sheppard JA, Ofosu FA.

Differences in the clinically effective molar concentrations of four direct thrombin inhibitors explain their variable prothrombin time prolongation.

Thromb Haemost. 2005; 94: 958-964

Watanabe R, Wada H, Sakakura M, Mori Y, Nakasaki T, Okugawa Y, Gabazza EC, Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K, Shiku H, Nobori T.

Plasma levels of activated protein C-protein C inhibitor complex in patients with hypercoagulable states.

Am J Hematol. 2000; 65: 35-40

Weisel JW.

Structure of fibrin: impact on clot stability.

J Thromb Haemost. 2007; 5: 116-124

Wong CK, White HD.

Direct antithrombins: mechanisms, trials, and role in contemporary interventional medicine.

Am J Cardiovasc Drugs. 2007; 7: 249-257

Worrall JA, Luisi BF.

Information available at cut rates: structure and mechanism of ribonucleases.

Curr Opin Struct Biol. 2007; 17: 128-137

Yan SB, Dhainaut JF.
Activated protein C versus protein C in severe sepsis.
Crit Care Med. 2001; 29: 69-74

Zucker MB, Nachmias VT.
Platelet activation.
Arteriosclerosis. 1985; 5: 2-18

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen persönlichen Dank an alle Menschen richten, die mich während der Dauer dieser Arbeit so tatkräftig unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die umfassende kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Großen Dank schulde ich Herrn Dr. Jens Müller für die allseits hilfreiche Unterstützung im Labor und seine wertvollen Ratschläge beim Erstellen dieser Arbeit. Er hat die Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung sowie vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und stets ein offenes Ohr für alle auftauchenden Probleme gehabt.

An alle Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin richtet sich mein Dankeswort für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Danken möchte ich Frau Ariane Cieslak, Mitarbeiterin des Medizinischen Dekanats, für ihre Unterstützung bei der formellen Gestaltung dieser Dissertation.

Besonders meiner Freundin möchte ich meine Dankbarkeit für ihre tatkräftige Unterstützung sowie das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit aussprechen. Sie hat einen entscheidenden Beitrag zur Erstellung dieser Arbeit geleistet.

Ein ausdrücklicher und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben, genauso meinen Geschwistern und meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.