

Untersuchungen zur Aktivierung des Gerinnungsfaktors XI

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anne Maja Friemann

aus Bonn

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pöttsch
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Dipl.-Biol. Birgit Stoffel-Wagner

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.05.2022

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Physiologie der Hämostase	10
1.1.1 Primäre Hämostase	10
1.1.2 Sekundäre Hämostase	12
1.1.2.1 Extrinsischer Weg der Gerinnungsaktivierung.....	13
1.1.2.2 Kontaktaktivierung oder intrinsischer Weg der Gerinnungsaktivierung	14
1.1.2.3 Regulationsmechanismen der plasmatischen Gerinnung.....	15
1.1.2.3.1 Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor-System.....	15
1.1.2.3.2 Antithrombin-Heparin-System	16
1.1.2.3.3 Protein-C-System.....	16
1.1.3 Fibrinolyse	17
1.2 Der Gerinnungsfaktor XI	19
1.2.1 Struktur und Synthese	20
1.2.2 Aktivierung von FXI und deren Regulation	23
1.2.2.1 Kontaktaktivierung	24
1.2.2.2 Aktivierung von FXI durch Thrombin	25
1.2.2.3 Potenzielle Kofaktoren von Thrombin bei der Aktivierung von FXI	26
1.2.2.4 Inhibitoren von FXIa.....	28
1.2.3 Substrate von FXIa	28
1.2.4 Klinische Bedeutung	29
1.2.4.1 Angeborener FXI-Mangel – Hämophilie C.....	30
1.2.4.2 Die Rolle von FXI bei der Thrombogenese	32
1.2.5 Labordiagnostik von FXI	33
1.3 Vorarbeiten zur Untersuchung der Gerinnungsaktivierung in vivo.....	35
1.3.1 Bestimmung von Thrombin mittels Oligonucleotide-based Enzyme Capture Assay (OECA).....	36
1.3.2 Untersuchungen zur perioperativen oder durch rFVIIa induzierten Gerinnungsaktivierung	37
1.4 Ziel der Arbeit	38

2. Material und Methoden	39
2.1 Verwendete Chemikalien	39
2.2 Verwendete Reagenzien.....	39
2.3 Verwendete Test-Kits.....	41
2.4 Verwendete Pufferlösungen.....	41
2.5 Verwendete Materialien	43
2.6 Verwendete Geräte.....	44
2.7 Angewandte Methoden	45
2.7.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
2.7.2 Enzyme Capture Assay (ECA) zur Bestimmung von aktiviertem FXI	46
2.7.3 Generierung von FXIa und Thrombin in vitro.....	48
2.7.3.1 rFVIIa-induzierte Thrombingenerierung in vitro	48
2.7.3.2 FXI-Aktivierung in vitro	50
2.7.3.3 Western Blot	51
2.7.4 Thrombin- und FXIa-Bildung in vivo	52
2.7.4.1 Probandenrekrutierung und Probengewinnung in der SHAPE-Kohorte.....	52
2.7.4.2 Probandenrekrutierung und Probengewinnung in der OP-Kohorte.....	53
2.7.4.3 Präanalytik und Probenlagerung	54
2.7.5 Weitere Laboranalytik	54
2.7.5.1 Automatisierte Bestimmungen mit dem Gerinnungsanalyser „BCS®-XP“	54
2.7.5.1.1 Gerinnungszeiten	55
2.7.5.1.2 Bestimmung von Gerinnungsfaktoren	55
2.7.5.1.3 Bestimmung von Gerinnungsinhibitoren.....	56
2.7.5.1.4 D-Dimer-Bestimmung.....	56
2.7.5.2 Bestimmung von indirekten Markern der Thrombinbildung mittels ELISA	57
2.7.5.3 OECA zur Bestimmung von in vivo generiertem Thrombin.....	57
2.7.5.4 STACLOT® VIIa-rTF-Assay zur FVIIa-Messung	59
2.7.6 Datenauswertung.....	59
3. Ergebnisse	60
3.1 Entwicklung des FXIa-ECA.....	60
3.1.1 Ermittlung der geeigneten Capture-Antikörper-Konzentration im FXIa-ECA.....	60
3.1.2 Ermittlung der geeigneten Benzamidinkonzentration im FXIa-ECA.....	61

3.1.3 Einfluss des Zymogens FXI auf die FXIa-Messung	63
3.1.4 Ermittlung der geeigneten Probenverdünnung	63
3.1.5 Untersuchung der präanalytischen Stabilität von FXIa in Abhängigkeit von Verdünnung, Lagerungszeit und Lagerungstemperatur	64
3.1.6 Einsatz eines Kofaktors für die thrombininduzierte FXI-Aktivierung in vitro	67
3.1.7 Western Blot	68
3.1.8 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Reproduzierbarkeit des FXIa-ECA... ..	69
3.2 FXI-Aktivierung in vitro	70
3.2.1 Aktivierung von FXI durch die Kontaktphase	70
3.2.2 Aktivierung von FXI durch Thrombin plus Kofaktor	71
3.2.3 FXIa-Generierung in vitro in FXI-Mangelplasma	73
3.3 rFVIIa-induzierte Thrombingenerierung in vitro	75
3.4 Thrombin- und FXIa-Bildung in vivo	78
3.4.1 Probandenmerkmale in der SHAPE-Kohorte	78
3.4.2 Pharmakokinetik von rFVIIa	79
3.4.3 Kinetik der FXIa- und Thrombinbildung in der SHAPE-Kohorte	79
3.4.4 Probandenmerkmale in der OP-Kohorte	82
3.4.5 Aktivierungskinetik verschiedener pro- und antikoagulatorischer Parameter in der OP-Kohorte	84
3.4.6 Aktivierungskinetik von FXIa in der OP-Kohorte	86
3.4.7 Korrelation zwischen dem Anstieg der Thrombin- und FXIa-Konzentration während operativer Eingriffe	87
3.4.8 Vergleich der Thrombin- und FXIa-Bildung in beiden klinischen Szenarien der Gerinnungsaktivierung in vivo	89
4. Diskussion	91
4.1 Anwendung des ECA zur Quantifizierung der FXIa-Generierung	92
4.2 Unterschiede in der Aktivierungsdynamik von FXI in vitro nach Kontaktaktivierung und Aktivierung durch Thrombin	93
4.3 Unterschiede in der Aktivierungsdynamik von FXI in vivo in zwei verschiedenen klinischen Szenarien	94
4.4 FXIa als prognostischer Biomarker und Ziel antikoagulatorischer Medikamente	97
5. Zusammenfassung	100

6. Abbildungsverzeichnis	101
7. Tabellenverzeichnis	103
8. Literaturverzeichnis	104
9. Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

A1 / A2 / A3 / A4	Apple-Domäne 1 bis 4
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASK	Arthroskopie
ASO	Antisense-Oligonukleotid
AT	Antithrombin
AUC	Area Under the Curve
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	Calibrated Automated Thrombogram
CTI	Corn-Trypsin-Inhibitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECA	Enzyme Capture Assay
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPCR	Endothelialer Protein-C-Rezeptor
ETP	Endogenes Thrombinpotenzial
F1+2	Prothrombinfragment 1+2
FII / FIIa	Faktor II / aktivierter Faktor II
FV / FVa	Faktor V / aktivierter Faktor V
FVL	Faktor-V-Leiden-Mutation
FVII / FVIIa	Faktor VII / aktivierter Faktor VII
FVIII / FVIIIa	Faktor VIII / aktivierter Faktor VIII
FIX / FIXa	Faktor IX / aktivierter Faktor IX
FX / FXa	Faktor X / aktivierter Faktor X
FXI / FXIa	Faktor XI / aktivierter Faktor XI
FXII / FXIIa	Faktor XII / aktivierter Faktor XII
FXIII / FXIIIa	Faktor XIII / aktivierter Faktor XIII

GFP	Gefrorenes Frischplasma
GP	Glykoproteinrezeptor
HMWK	Hochmolekulares Kininogen
IQR	Interquartilbereich
LLOQ	Lower Limit of Quantification
LOD	Limit of Detection
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NPP	Normales Poolplasma
OECA	Oligonucleotide-based Enzyme Capture Assay
OP	Operation
ORIF	Offene Reposition und osteosynthetische Fixierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC	Protein C
PRP	Plättchenreiches Plasma
PS	Protein S
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
rFVIIa	Rekombinanter Faktor VIIa
RNA	Ribonukleinsäure
r_s	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient
rTF	Rekombinanter Tissue Factor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERPIN	Serinprotease-Inhibitor
SHAPE	Stimulated Hemostasis Activity Pattern Evaluation
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TAFI	Thrombinaktivierbarer Fibrinolyseinhibitor
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TBS	Tris-buffered Saline
TEP	Totalendoprothese

TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TMB	Tetramethylbenzidin
TPZ	Thromboplastinzeit
u-PA	Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator
VK	Variationskoeffizient
VKB	Vorderes Kreuzband
VTE	Venöse Thromboembolie
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

Die Blutgerinnung ist ein lebenswichtiger komplexer Prozess, der zum Verschluss einer Gefäßwandverletzung führt und eine Blutung beendet. Um einen größeren Blutverlust zu verhindern, muss die Gerinnungsbildung rasch und effektiv einsetzen, jedoch auf den Ort der Verletzung begrenzt bleiben. Bei intakter Gefäßwand muss die Fluidität des Blutes erhalten bleiben und eine pathologische Thrombusbildung verhindert werden. Hierzu bedarf es einer feinen Regulierung der einzelnen Schritte, die sowohl die Thrombusentstehung als auch die Auflösung von Thromben umfassen. Die Gesamtheit der beteiligten Prozesse wird unter dem Begriff „Hämostase“ zusammengefasst.

Diese Arbeit befasst sich mit der Aktivierung des Gerinnungsfaktors XI (FXI), einem von mehreren am Gerinnungsprozess beteiligten Plasmaproteinen. Bevor detailliert auf dessen Funktion und Bedeutung eingegangen wird, werden in den folgenden Abschnitten der Einleitung zunächst die wichtigsten Schritte der Hämostase und Fibrinolyse zusammengefasst.

1.1 Physiologie der Hämostase

Nach einer Gefäßwandverletzung führen die simultan ablaufenden Prozesse der primären und sekundären Hämostase zur Bildung eines aus Thrombozyten und Fibrin bestehenden Gerinnsels, welches durch das fibrinolytische System wieder abgebaut wird.

1.1.1 Primäre Hämostase

Die zentrale Rolle in der primären Hämostase spielen die Thrombozyten. Thrombozyten sind kleine, zellkernlose Zellfragmente, welche im Blut von Gesunden in einer Zahl von 150 bis 400 Millionen/ml bis zu 10 Tage lang zirkulieren (Mussbacher et al., 2019).

Ziel der primären Hämostase ist die Entstehung eines dreidimensionalen Netzwerks aus Thrombozyten, welches einen Defekt der Gefäßwand abdeckt und somit eine Blutung verhindert bzw. stillt. Hierzu verfügen die Thrombozyten über Adhäsionsmechanismen, die eine Zell-Matrix- und eine Zell-Zell-Interaktion ermöglichen. Außerdem sind sie in der Lage, gerinnungsfördernde Substanzen in das Blut abzugeben. Die Phasen, welche die Thrombozyten während der primären Hämostase durchlaufen, lassen sich in Adhäsion, Aktivierung und Aggregation unterteilen (Gale, 2011).

Intaktes Endothel, welches die Gefäßwand auskleidet, verfügt unter physiologischen Bedingungen durch die Abgabe von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin über anti-adhäsive Eigenschaften. Die Thrombozyten zirkulieren in ihrer inaktiven Form frei im Blut. Kommt es zu einer Gefäßverletzung mit Endothelschaden, werden subendotheliale Strukturen freigelegt, welche mit den zellulären und plasmatischen Elementen des Gerinnungssystems interagieren. Eine wichtige Rolle in der primären Blutstillung spielt der im Blut zirkulierende und in der subendothelialen Matrix gespeicherte von-Willebrand-Faktor (vWF), der in Form eines Adapterproteins sowohl an das freigelegte subendotheliale Bindegewebsprotein Kollagen als auch an die Glykoproteinrezeptoren (GP-) Ib und IIb/IIIa der Thrombozytenoberfläche bindet. Außerdem können die Thrombozyten durch den GP-VI selbst an das Kollagen binden. Der Endothelschaden wird durch die Adhäsion der Thrombozyten bedeckt und die gebildete Thrombozytenschicht kann als Promotor der sekundären Hämostase dienen (Fredenburgh und Weitz, 2018).

Im an die Adhäsion anschließenden Schritt der Thrombozytenaktivierung werden die wandadhärenten Thrombozyten aktiviert, verändern ihre Form und bilden Pseudopodien aus. Es kommt zur Sekretion von in den Thrombozyten enthaltenen Granula-Inhaltsstoffen. In den Granula werden unter anderem Gerinnungsfaktoren, Adhäsions- und Membranproteine, Chemokine, Interleukine und Wachstumsfaktoren gespeichert (Mussbacher et al., 2019). Sezernierte Mediatoren wie vWF und Fibronectin führen zur Adhäsion weiterer Thrombozyten. Adenosindiphosphat (ADP) bindet an ADP-Rezeptoren weiterer Thrombozyten, welche dadurch aktiviert werden. Ebenso bewirkt an der Plasmamembran synthetisiertes Thromboxan A₂ eine Aktivierung weiterer Thrombozyten. Außerdem führt eine thrombininduzierte Spaltung der in der Thrombozytenmembran gelegenen Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR) 1 und 2 zur Thrombozytenaktivierung. Gleichzeitig werden Kofaktoren der sekundären Hämostase ausgeschüttet und negativ geladene, Ca²⁺-bindende Phospholipide in die Thrombozytenmembran eingebaut, wodurch die sekundäre Hämostase unmittelbar an der Thrombozytenoberfläche initiiert wird. Sezerniertes α 2-Antiplasmin bewirkt eine Hemmung der Fibrinolyse. Ebenfalls sezerniertes Serotonin wirkt vasokonstriktorisch und begünstigt so die Blutstillung (Rassow, 2008).

Die Phase der Thrombozytenaggregation wird durch die Konformationsänderung mehrerer in der Thrombozytenmembran verankerter Rezeptoren, darunter auch der GP-IIb/IIIa-Komplex, während der Aktivierung ermöglicht. Dadurch werden Bindungsstellen für Liganden zugänglich, die die Thrombozyten insbesondere untereinander, aber auch weiter mit der subendothelialen Matrix vernetzen. Zu diesen Liganden gehören – neben dem bereits erwähnten vWF – Kollagen, Fibronectin und von den Thrombozyten sezerniertes Fibrinogen (Gale, 2011). Durch die Aggregation der aktivierten Thrombozyten bildet sich ein Thrombozytenpfropf, der sogenannte „weiße Thrombus“, der die Blutung zunächst stillt, jedoch ohne ein Fibringerüst relativ instabil ist.

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Ziel der sekundären oder plasmatischen Hämostase ist die Bildung eines stabilen Fibrin-Netzwerkes, das gemeinsam mit den Thrombozyten den „roten Thrombus“ bildet und die Wunde sicher verschließt. Dies wird über die Aktivierung der Gerinnungskaskade erreicht. Die im Plasma in Form von Zymogenen zirkulierenden Gerinnungsfaktoren, von denen die meisten Serinproteasen sind, werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Gerinnungsfaktoren aktivieren sich untereinander so, dass ein stufenartiger, sich selbst verstärkender Prozess abläuft. Das ursprüngliche Modell der Gerinnungskaskade wurde bereits 1964 beschrieben (Davie und Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Nachdem zunächst der intrinsische Aktivierungsweg der Gerinnung beobachtet worden war, folgte 1974 die Entdeckung der extrinsischen Kaskade (Jesty et al., 1974). Man fand heraus, dass beide Wege unabhängig voneinander aktivierbar sind und in eine gemeinsame Endstrecke münden, in der die aktivierte Serinprotease Thrombin zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin führt. Inzwischen weiß man, dass beide Wege parallel ablaufen, eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig verstärken (Davie et al., 1991). Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Modells der Gerinnungskaskade.

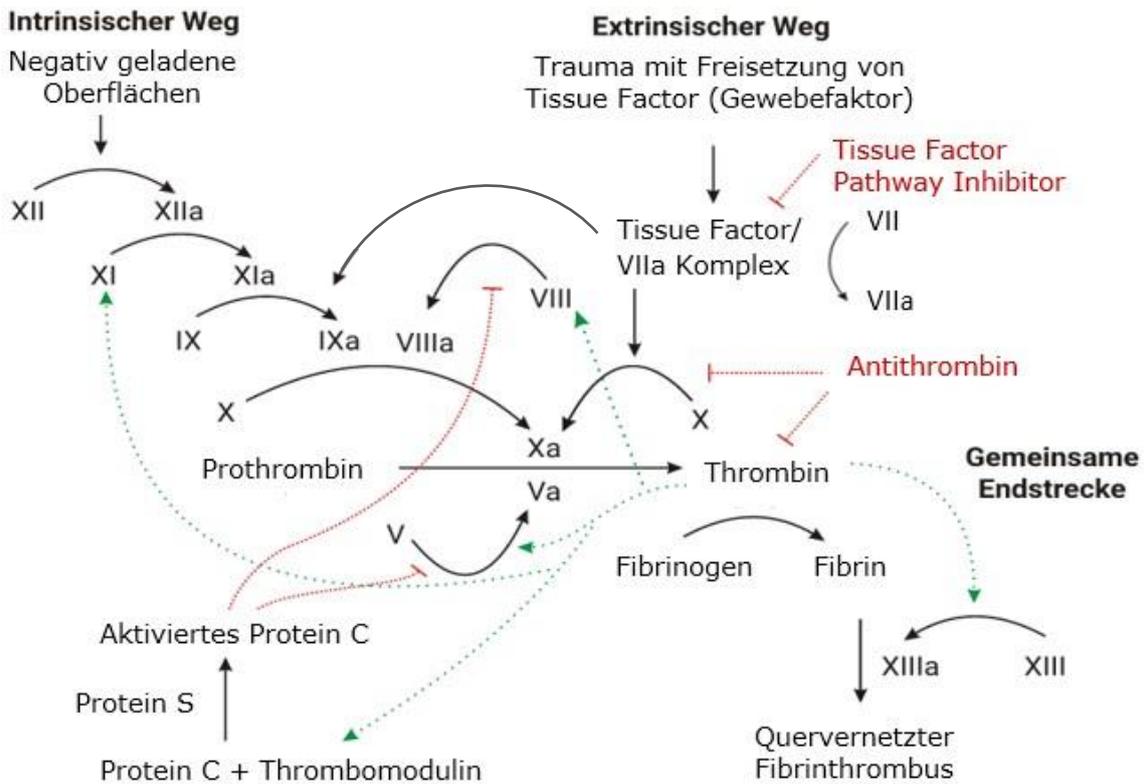


Abb. 1: Übersicht über den intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweg der sekundären Hämostase

Die römischen Ziffern bezeichnen die jeweiligen Gerinnungsfaktoren, der Zusatz a kennzeichnet jeweils die enzymatisch aktive Form. Die schwarzen Pfeile geben den Verlauf der Kaskade wieder. Die grünen Pfeile zeigen die weiteren Substrate von Thrombin an. Inhibitorische Wirkungen sind in Rot gekennzeichnet (Modifiziert übernommen aus Joe, 2007).

1.1.2.1 Extrinsischer Weg der Gerinnungsaktivierung

Unter physiologischen Bedingungen spielt das extrinsische System die größere Rolle bei der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung als das intrinsische System. Bei einer Verletzung des Endothels kommt Blut mit subendothelial gelegenem Tissue Factor (TF, Gewebefaktor) in Kontakt. TF bindet sowohl an im Blut zirkulierenden bereits aktivierten Faktor VII (FVIIa) als auch an dessen Zymogen (FVII), welches dadurch wiederum aktiviert wird. Im Komplex mit TF wird die proteolytische Aktivität von FVIIa erheblich gesteigert (Monroe und Key, 2007). Zusammen mit Phospholipiden an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und Ca^{2+} aktiviert der TF/FVIIa-Komplex zunächst geringe Mengen Faktor IX (FIX) zu Faktor IXa (FIXa) und Faktor X (FX) zu Faktor Xa (FXa). FXa

generiert geringe Mengen Thrombin (FIIa) aus Prothrombin (FII) durch proteolytische Spaltung. Thrombin aktiviert im Verlauf weitere Gerinnungsfaktoren, die dann im Rahmen einer positiven Verstärkung wiederum deutlich größere Mengen Thrombin generieren. Neben FXI werden auch die im Blut zirkulierenden und von aktivierten Thrombozyten sezernierten Faktoren V (FV) und VIII (FVIII) durch Thrombin aktiviert. Aktivierter FVIII (FVIIIa) bildet mit FIXa einen Komplex, der in Anwesenheit von Ca^{2+} und Phospholipiden deutlich größere Mengen FX aktivieren kann. FXa wiederum bildet in Anwesenheit von Ca^{2+} und Phospholipiden einen proteolytisch aktiven Komplex mit aktiviertem FV (FVa), den Prothrombinase-Komplex (Eilertsen und Østerud, 2004; Mackman, 2009). Die Endstrecke der Kaskade ist damit erreicht. Der Prothrombinase-Komplex überführt große Mengen des inaktiven Prothrombins in das aktive Thrombin. Thrombin spaltet Fibrinopeptide des Hexamers Fibrinogen ab, sodass sich benachbarte Fibrinmonomere miteinander zu Polymeren verbinden können. Es entsteht ein netzartiges Fibrin-Aggregat. Das Aggregat wird letztendlich mithilfe des ebenfalls durch Thrombin aktivierten Faktor XIII (FXIIIa) über kovalente Bindungen zwischen den Carboxyl-Termini (D-Domänen) der Fibrinfibrillen quervernetzt. Es entsteht ein unlösliches Fibrinnetzwerk, welches den Thrombozytenpfropf durchbaut und stabilisiert (Hiller, 2007).

1.1.2.2 Kontaktaktivierung oder intrinsischer Weg der Gerinnungsaktivierung

Die intrinsische Aktivierung der plasmatischen Gerinnung spielt vor allem eine Rolle, wenn Blut in Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen kommt. Bei der sogenannten Kontaktaktivierung kommt es zum Beispiel durch Glas, Kollagen, Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), Amyloid oder Polyphosphate aus Bakterien und Zellen zu einer Autoaktivierung von Faktor XII (FXII) zu Faktor XIIa (FXIIa) (Schmaier, 2016). FXIIa aktiviert FXI zu Faktor XIa (FXIa), welcher wiederum FIX in Anwesenheit von Ca^{2+} proteolytisch zu FIXa aktiviert. FIXa bildet zusammen mit FVIIIa, Ca^{2+} und Phospholipiden den Tenase-Komplex, der FX aktiviert. Anschließend folgt die bereits beschriebene Endstrecke durch die Bildung des Prothrombinase-Komplexes, der Prothrombin zu Thrombin aktiviert, welches wiederum Fibrinogen zu Fibrin spaltet (Hiller, 2007).

Da FXI neben FXIIa auch durch Thrombin und FIX neben FXIa auch durch den TF/FVIIa-Komplex und durch Thrombin aktiviert werden, liegt eine enge Verknüpfung des extrinsischen und intrinsischen Systems vor. Inzwischen weiß man, dass die initiale

Gerinnungsaktivierung über das Kontaktsystem in vivo eher eine untergeordnete Rolle spielt. Dies spiegelt sich in der klinischen Beobachtung wider, dass bei Menschen mit einem FXII-Mangel keine Blutungsneigung beobachtet wird (Naudin et al., 2017; Stavrou und Schmaier, 2010). Darüber hinaus wurde in Tierversuchen gezeigt, dass die FXIIa-induzierte Aktivierung von FXI zu einer pathologischen Thrombusformation und somit zu Thrombosen führen kann (Cheng et al., 2010; Kleinschnitz et al., 2006; Matafonov et al., 2014).

1.1.2.3 Regulationsmechanismen der plasmatischen Gerinnung

Es bedarf einer genauen Regulation der einzelnen Prozesse der Blutgerinnung, um diese auf den Ort der Verletzung und ein angemessenes Maß zu beschränken. Es gibt verschiedene Proteine, die die proteolytische Aktivität einiger Gerinnungsfaktoren spezifisch hemmen und so eine Blutgerinnung limitieren können. Ein Mangel dieser Inhibitoren kann mit einem erhöhten Thromboserisiko einhergehen.

1.1.2.3.1 Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor-System

Ein Inhibitor, der früh regulatorisch in den extrinsischen Aktivierungsweg eingreift, ist der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Es liegen verschiedene Isoformen dieses Enzyms in Endothelzellen, Thrombozyten und im Plasma vor. TFPI ist in Anwesenheit von FXa ein potenter Inhibitor des TF/FVIIa-Komplexes. Sobald in der initialen Phase der Blutgerinnung FXa gebildet wird, findet eine negative Rückkopplung des extrinsischen Aktivierungswegs durch die Inhibition des TF/FVIIa-Komplexes statt. Darüber hinaus inhibiert TFPI die in der initialen Phase gebildete Prothrombinase, indem er FV bindet und dessen Aktivierung hemmt, solange noch kein Thrombin generiert wurde. Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass eine überschießende Gerinnungsaktivierung bei nur geringen Stimuli ausbleibt. Sobald jedoch größere Mengen FXa und in der Folge auch Thrombin generiert werden, fällt die inhibitorische Wirkung auf den Prothrombinase-Komplex weg und die plasmatische Gerinnung verstärkt sich TF-unabhängig über positive Feedback-Mechanismen (Mast, 2016).

1.1.2.3.2 Antithrombin-Heparin-System

Der in der Leber synthetisierte Serinprotease-Inhibitor (SERPIN) Antithrombin (AT) ist in der Lage, in Abwesenheit einer Gefäßverletzung eine Reihe von proteolytisch aktiven Gerinnungsfaktoren zu inaktivieren. Da AT ein potenter Inhibitor von Thrombin und FXa ist, greift es zentral in die Gerinnungskaskade und insbesondere in die durch Thrombin induzierten Feedback-Mechanismen ein und kann so eine übermäßige Gerinnung verhindern. Außerdem hemmt es die Faktoren XIIa, XIa und IXa. Das inhibitorische Potenzial von AT kann durch seine Kofaktoren Heparin und Heparansulfat verstärkt werden. Das in der Plasmamembran von Endothelzellen verankerte Glykosaminoglykan Heparansulfat sorgt bei intaktem Endothel über die Bindung von AT für eine Gerinnungshemmung. In der Anwesenheit von Heparin verstärkt sich die Affinität von AT zu den Gerinnungsfaktoren durch eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums um das bis zu 1000-Fache (Rassow, 2008). Parenteral verabreichtes Heparin spielt eine Schlüsselrolle bei der Prophylaxe und Therapie von Thrombosen (Hao et al., 2019).

1.1.2.3.3 Protein-C-System

Protein C (PC) zirkuliert im Plasma als Zymogen einer gerinnungshemmenden Serinprotease. Im Plasma zirkulierendes freies Protein S (PS) dient als Kofaktor von aktiviertem Protein C (APC). Beide Proteine werden Vitamin-K-abhängig in der Leber synthetisiert. PC wird durch Thrombin proteolytisch aktiviert. Ohne Thrombomodulin geschieht dies in geringen Mengen und ineffizient. Eine deutlich stärkere Affinität zu PC erlangt Thrombin, wenn es an Thrombomodulin, ein in der Plasmamembran von intaktem Endothel verankertes Glykoprotein, gebunden wird. Thrombin verändert durch die Bindung seine Substratspezifität von Fibrinogen zu PC, welches durch den Thrombin/Thrombomodulin-Komplex aktiviert wird (Hiller, 2007). Die Aktivierung von PC wird außerdem durch eine Bindung an den endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) verstärkt. Thrombin selbst wird durch die Bindung an Thrombomodulin deutlich schneller durch plasmatische Proteaseinhibitoren inaktiviert als freies Thrombin, was zu einer schnelleren Elimination von Thrombin in Abwesenheit einer Gefäßverletzung führt (Esmon, 2003).

APC bildet an negativ geladenen Phospholipidoberflächen in Anwesenheit von Ca^{2+} einen Komplex mit dem Kofaktor PS. Dieser Komplex inaktiviert durch limitierte Proteolyse FVa

und FVIIIa, sodass die lokale Thrombingenerierung deutlich reduziert wird. Menschen mit einer bestimmten Mutation im Bereich der APC-Bindungsstelle von FV haben ein höheres Thromboserisiko, da FVa nicht durch APC gehemmt werden kann und somit APC-resistent ist. Diese wird nach dem Ort ihrer Entdeckung als Faktor-V-Leiden-Mutation (FVL) bezeichnet (Bertina et al., 1994). Außerdem steigert APC durch die Hemmung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI) die fibrinolytische Aktivität (Fouw et al., 1987). Darüber hinaus besitzt PS weitere, von APC unabhängige, regulatorische Eigenschaften. Es inhibiert FIXa und somit den Tenase-Komplex, und es wirkt als Kofaktor des TFPI (Fricke et al., 2019; Rosing et al., 2008).

1.1.3 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse als Gegenspieler der Blutgerinnung ist ein körpereigener Prozess, um Blutgerinnsel aufzulösen. Sie dient als wichtiger Regulationsmechanismus, sowohl um die Gerinnselbildung auf den Ort der Verletzung zu begrenzen als auch zur Rekanalisation eines bereits thrombosierten Gefäßes.

Eine Schlüsselrolle spielt hierbei das Enzym Plasmin, das durch Plasminaktivatoren proteolytisch aus dem in der Blutbahn zirkulierenden Plasminogen gebildet wird. Plasmin baut als Serinprotease Fibrin in Fibrinospaltprodukte ab, wobei die durch FXIIIa geschaffenen kovalenten Bindungen zwischen den D-Domänen der Fibrinfibrillen nicht gespalten werden können. Es verbleiben die sogenannten D-Dimere, welche als Indikator für eine im Körper stattgehabte Gerinnselbildung im Blut nachgewiesen werden können. Zu den körpereigenen Plasminaktivatoren gehören der gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA) und der Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator (u-PA). Die Serinprotease t-PA ist in Endothelzellen gespeichert und wird durch Thrombin freigesetzt. Bei hoher Affinität zu seinem Kofaktor Fibrin wirkt t-PA durch eine Komplexbildung mit Plasminogen und dessen Aktivierung unmittelbar dort, wo sich ein Gerinnsel gebildet hat. Frei in der Blutbahn zirkulierender t-PA wird schnell von Proteaseinhibitoren inaktiviert (Petrides, 2007). u-PA aktiviert rezeptorgebunden und fibrinunabhängig ebenfalls Plasminogen zu Plasmin. Der in Zellmembranen verankerte Urokinase-Rezeptor bindet sowohl Prourokinase als auch Urokinase selbst. Dabei wird Prourokinase in Anwesenheit geringer Mengen Plasmin im Sinne einer gegenseitigen Zymogenaktivierung zu Urokinase aktiviert (Plesner et al., 1997). Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Fibrinolyse.

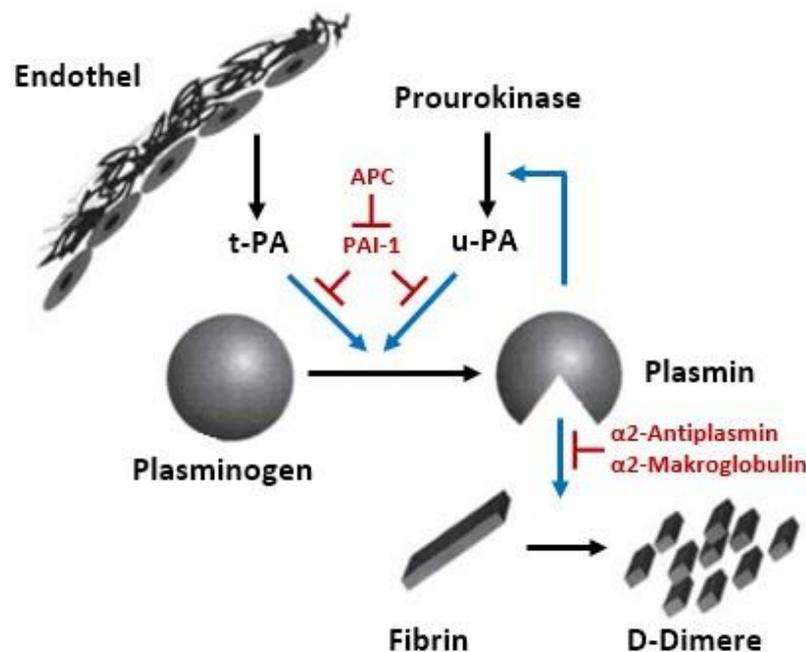


Abb. 2: Fibrinolytisches System mit aktivierenden (\rightarrow) und inhibierenden (\dashv) Prozessen APC, aktiviertes Protein C; u-PA, Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator; t-PA, gewebespezifischer Plasminogenaktivator; PAI-1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (Modifiziert übernommen aus Hiller, 2007).

Zu den exogenen Plasminogenaktivatoren gehören die Streptokinase aus Streptokokken und der rekombinant synthetisierte t-PA. Streptokinase bildet mit Plasminogen einen Komplex, welcher weitere Plasminogenmoleküle in Plasmin umwandelt (Petrides, 2007).

Ebenso wie das Hämostasesystem unterliegt auch das fibrinolytische System einer engmaschigen Regulation. Eine zentrale regulatorische Rolle spielen dabei die PAI. Insbesondere PAI Typ 1 (PAI-1) besitzt durch die Hemmung von t-PA und u-PA eine starke antifibrinolytische Aktivität. PAI-1 wird durch Endothelzellen gebildet und in Thrombozyten gespeichert. So wird eine Hemmung der Fibrinolyse zu Beginn der Blutstillung am Ort der Verletzung gewährleistet. Ein weiterer Regulator ist der thrombinaktivierbare Fibrinolyseinhibitor (TAFI). Er wird durch den Thrombin/Thrombomodulin-Komplex, Thrombin allein oder Plasmin aktiviert und spaltet den C-terminalen Lysinrest des Fibrins ab, wodurch eine Bindung von Plasminogen an Fibrin verhindert wird (Chapin und Hajjar, 2015).

Eine direkte Hemmung von Plasmin und Plasminogen wird durch den Plasmininhibitor α_2 -Antiplasmin bewirkt. Dieser bindet als kompetitiver Inhibitor an die Fibrin-Bindungsstelle von Plasmin und Plasminogen. Außerdem sorgt α_2 -Antiplasmin außerhalb eines zu lysierenden Thrombus dafür, dass die unspezifische Protease Plasmin keine anderen Proteine spaltet. Darüber hinaus trägt durch FXIIIa kovalent an Fibrin gebundenes α_2 -Antiplasmin in der Frühphase der Gerinnung zur Stabilität des Gerinnsels bei. Weitere unspezifische Proteasen, die Plasmin inaktivieren können, sind PAI Typ 3 und das Akute-Phase-Protein α_2 -Makroglobulin (Geiger, 2010).

Neben der Spaltung von Fibrin besitzt Plasmin eine breite proteolytische Aktivität gegenüber weiteren Gerinnungsfaktoren, Proteinen der extrazellulären Matrix, Metalloproteasen, Zellrezeptoren, Wachstumsfaktoren und Hormonen (Hoover-Plow, 2010). Insbesondere können durch Plasmin auch Fibrinogen, FV und FVIII abgebaut werden. Die Fibrinogenspaltprodukte hemmen ihrerseits die Thrombinbildung und die Fibrinpolymerisation, sodass die Fibrinolyse durch eine simultane Hemmung der Blutgerinnung unterstützt wird (Petrides, 2007).

1.2 Der Gerinnungsfaktor XI

Zu Beginn der nun folgenden detaillierten Betrachtung des FXI soll noch einmal dessen besondere Stellung innerhalb der bereits beschriebenen Kaskadenmodelle herausgestellt werden. Nach einer Gefäßverletzung kommt es zunächst durch die TF/FVIIa-vermittelte Aktivierung von FIX und FX zur Generierung geringer Mengen Thrombin. Da der TF/FVIIa-Komplex jedoch schnell durch TFPI gehemmt wird, sind weitere Mechanismen zur Aufrechterhaltung und Verstärkung der Thrombingenerierung erforderlich, bis ausreichende Mengen Fibrin zur Gerinnung gebildet wurden.

Hierbei kommt FXIa eine Schlüsselrolle als Verstärker der Thrombingenerierung zu (Abb. 3). FXI wird nicht nur durch FXIIa im Rahmen der Kontaktaktivierung, sondern auch durch das bereits gebildete Thrombin aktiviert. So agiert FXI als Bindeglied zwischen intrinsischem und extrinsischem System (Gailani und Broze, 1991; Broze, 1995).

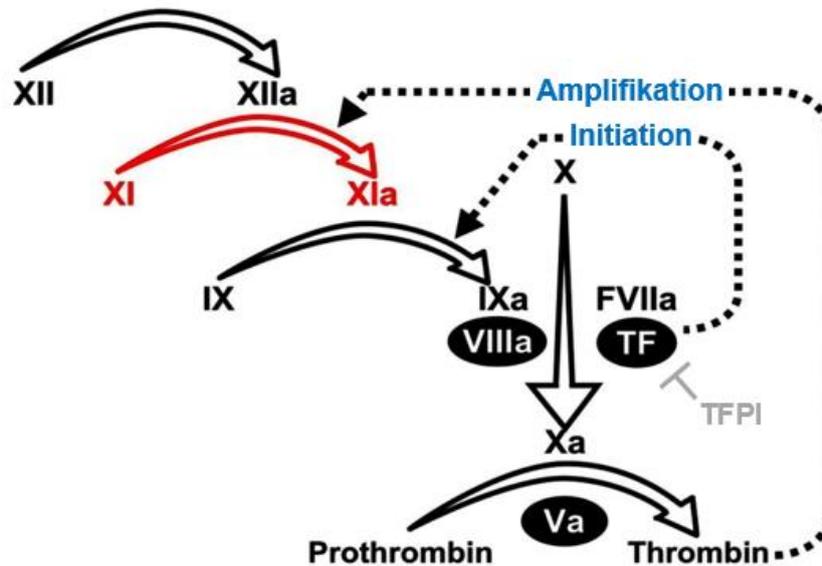


Abb. 3: Die Rolle des FXI als positiver Verstärker der Thrombingenerierung. Während der Initiationsphase werden geringe Mengen Thrombin über den Tissue Factor (TF)/FVIIa-Komplex generiert, wobei dieser Komplex schnell durch den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) gehemmt wird. Während der Amplifikationsphase kommt es danach durch die thrombininduzierte Aktivierung von FXI zu einer positiven Verstärkung der Thrombingenerierung. Die römischen Ziffern bezeichnen die jeweiligen Gerinnungsfaktoren, der Zusatz a kennzeichnet die enzymatisch aktive Form. Die ungefüllten Pfeile stellen die Aktivierungsschritte der einzelnen Gerinnungsfaktoren dar. Die unterbrochenen Pfeile kennzeichnen die Verstärkungsmechanismen der Thrombingenerierung. Kofaktoren sind in schwarzen Ovalen dargestellt (Modifiziert übernommen aus Emsley et al., 2010).

Während die Struktur und die Substrate von FXI/FXIa bereits wohlbekannt sind, ist der physiologische Ablauf der FXI-Aktivierung in vivo bislang nicht vollständig geklärt und soll daher in dieser Arbeit weiter untersucht werden. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die bekannten strukturellen und funktionellen Eigenschaften von FXI genauer erläutert.

1.2.1 Struktur und Synthese

FXI ist das Zymogen der Serinprotease FXIa. FXI zirkuliert im Plasma in einer Konzentration von ungefähr 5 mg/l (~30 nmol/l) überwiegend in einem Komplex mit hochmolekularem Kininogen (HMWK), welches eine Bindung von FXI an negativ geladene Oberflächen begünstigt. FXI ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten

mit einem Molekulargewicht von jeweils 80 kDa. Eine Untereinheit besteht aus 607 Aminosäuren, die N-terminal die aus repetitiven Sequenzen bestehenden sogenannten Apple-Domänen (A1 bis A4) und C-terminal eine katalytische Proteasedomäne bilden (Abb. 4). Die vier Apple-Domänen haben eine Länge von jeweils 90 oder 91 Aminosäuren, sind aus sieben β -Faltblattstrukturen und einer α -Helix aufgebaut und besitzen jeweils drei charakteristische Disulfidbrücken. Zusammen bilden sie in jeder Untereinheit eine planare Scheibe. Innerhalb der verschiedenen Apple-Domänen konnten unterschiedliche Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die mit den Substraten und Kofaktoren von FXI interagieren. So besitzt die A1-Domäne eine Bindungsstelle für Thrombin und vermutlich auch für HMWK. In der A2-Domäne befindet sich eine Sequenz, die ebenfalls mit HMWK interagiert. Die A2- und die A3-Domäne besitzen jeweils eine Bindungsstelle für FIX. Des Weiteren besitzt die A3-Domäne eine basische Aminosäuresequenz, die eine Bindungsstelle für Polyanionen darstellt. Eine weitere derartige basische Bindungsstelle befindet sich auch in der Proteasedomäne (Emsley et al., 2010; Mohammed et al., 2018). Darüber hinaus besitzt die A3-Domäne eine Bindungsstelle für aktivierte Thrombozyten, wobei für die Bindung an GP-Ib der aktivierten Thrombozyten die Kofaktoren HMWK und Zn^{2+} benötigt werden (Baglia et al., 2002). Über eine Disulfidbrücke sind die A4-Domänen zweier FXI-Monomere miteinander verknüpft. Weitere Aminosäuresequenzen in der A4-Domäne tragen zur Stabilität der Dimerstruktur bei. Die genaue Bindungsstelle für FXIIa ist bislang nicht bekannt. Eine Interaktion zwischen FXIIa und FXI wird sowohl auf der A2- als auch auf der A4-Domäne vermutet (Mohammed et al., 2018).

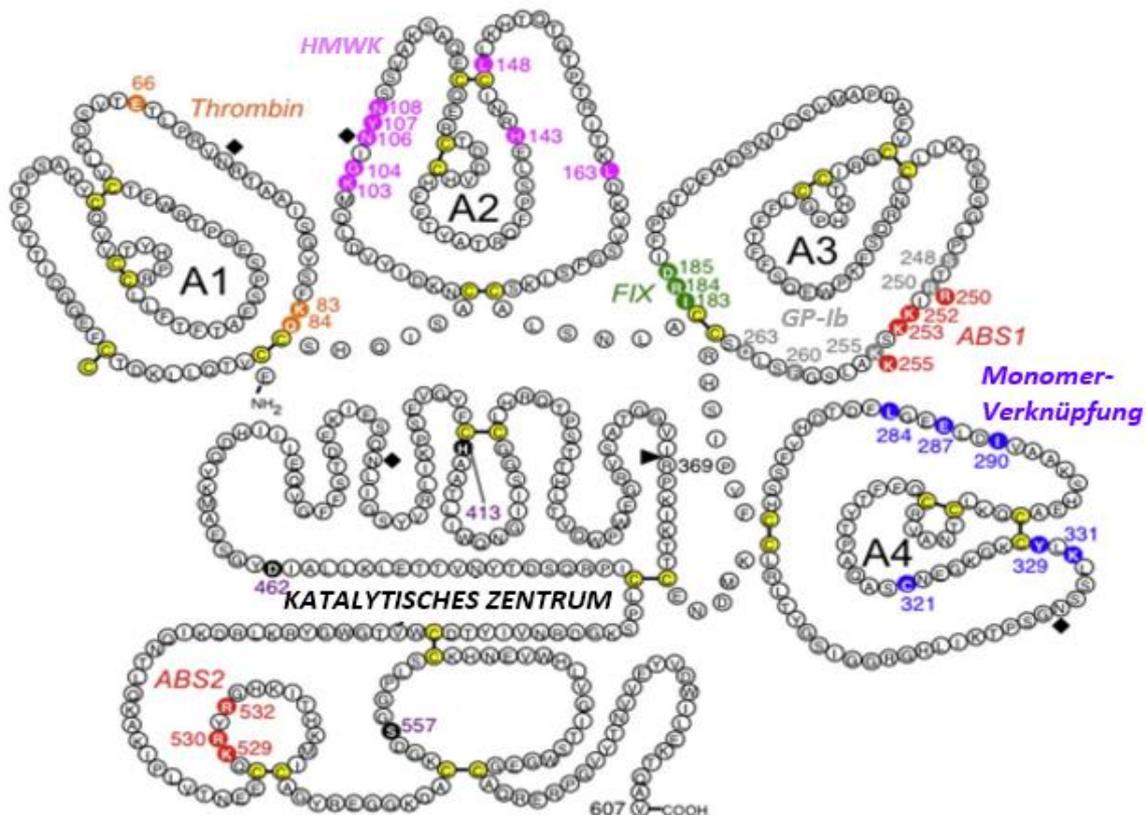


Abb. 4: Die molekulare Struktur eines FXI-Monomers

A1-A4, Apple-Domänen 1 bis 4; orange markierte Aminosäuren (AS), Bindungsstellen für Thrombin; violett markierte AS, Bindungsstellen für hochmolekulares Kininogen (HMWK); grün markierte AS, Bindungsstellen für FIX; grau markierte AS, Bindungsstelle für den Glykoproteinrezeptor Ib (GP-Ib) der Thrombozyten; rot markierte AS, Anionenbindungsstellen 1 und 2; blau markierte AS, Bindungsstelle zwischen zwei FXI-Monomeren; gelb markierte AS, Cystein mit Disulfidbrückenbindungen; schwarz markierte AS, katalytische Triade. Die Aktivierung von FXI zu FXIa erfolgt durch die Spaltung nach Arg369 (►). ♦-Markierungen kennzeichnen Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen (Modifiziert übernommen aus Mohammed et al., 2018).

Beide FXI-Monomere werden durch die Spaltung nach Arginin an Position 369 aktiviert, wobei die Dimerstruktur erhalten bleibt. Durch die Aktivierung entstehen jeweils eine schwere (~50 kDa) und eine leichte (~30 kDa) Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die schwere Kette enthält die vier Apple-Domänen, die leichte Kette das für Serinproteasen typische aktive Zentrum, bestehend aus der katalytischen Triade Histidin, Asparaginsäure und Serin (Mohammed et al., 2018).

Die Struktur von FXI ähnelt stark dem Aufbau von Präkallikrein. Die aus 15 Exonen bestehenden Gene beider Proteine sind im distalen Ende des langen Arms von

Chromosom 4 (4q35) kodiert. Es wird davon ausgegangen, dass das FXI-Gen durch Duplikation aus dem Präkallikrein-Gen entstanden ist und durch einige strukturelle Änderungen seine prokoagulatorische Aktivität erlangt hat (Mohammed et al., 2018).

FXI wird hauptsächlich in Hepatozyten Vitamin-K-unabhängig synthetisiert. Dabei wird die Expression von FXI durch den Transkriptionsfaktor Hepatozytennuklearfaktor-4 α reguliert (Tarumi et al., 2002). Geringe Mengen FXI werden zudem in den Langerhans-Inseln des Pankreas sowie in den Nierentubuli synthetisiert (Cheng et al., 2008). Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, ob FXI auch von Zellen der Megakaryopoese synthetisiert wird. Für diese Hypothese spricht, dass in aktivierten Thrombozyten ein höherer Anteil reifer messenger-RNA (mRNA) von FXI nachgewiesen werden konnte als in inaktiven Thrombozyten (Zucker et al., 2018).

1.2.2 Aktivierung von FXI und deren Regulation

FXI wurde erstmals 1953 durch Robert Rosenthal beschrieben (Rosenthal et al., 1953). 1959 erkannte man, dass FXI in vitro durch FXIIa aktiviert wird (Hardisty und Margolis, 1959; Soulier und Prou-Wartelle, 1960), woraufhin 1964 der Ablauf der intrinsischen Kaskade aufgeklärt wurde (Davie und Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Die Komponenten des intrinsischen Systems wurden zunächst als die klinisch wichtigsten Faktoren der Gerinnungsaktivierung angesehen. Dies lag unter anderem daran, dass ein Mangel an FVIII und FIX mit einer schweren Blutungsneigung einhergeht. Es wurde ein Gerinnungstest etabliert, der die Gerinnungszeit nach Aktivierung des intrinsischen Systems in vitro messen konnte (Langdell et al., 1953). Mit dieser sogenannten partiellen Thromboplastinzeit (PTT) war es möglich, Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren des intrinsischen Systems zu diagnostizieren.

Im Widerspruch zu der Annahme, dass FXI hauptsächlich durch FXIIa aktiviert wird, stand bereits damals die klinische Beobachtung, dass Menschen mit einem FXII-Mangel kein erhöhtes Blutungsrisiko haben (Ratnoff und Margolius, 1955). In vivo musste es daher mindestens einen weiteren FXI-Aktivator geben. 1991 wurde Thrombin als alternativer Aktivator von FXI postuliert (Naito und Fujikawa, 1991). Durch die zentrale Rolle des Thrombins innerhalb der Gerinnungskaskade scheint dieser Weg der FXI-Aktivierung physiologisch relevanter zu sein. In vitro konnte in Anwesenheit von Kofaktoren eine FXI-Aktivierung durch Thrombin nachgewiesen werden (Naito und Fujikawa, 1991). In vivo

sind die genauen Abläufe der FXI-Aktivierung jedoch bislang nicht hinreichend verstanden.

1.2.2.1 Kontaktaktivierung

Durch den Kontakt von FXII zu negativ geladenen Oberflächen kommt es zu einer Konformationsänderung und Spaltung des Proteins im Sinne einer Autoaktivierung. Der auf diese Weise aktivierte FXII wird als α -FXIIa bezeichnet, bei dem die durch die Spaltung gebildete schwere und leichte Kette über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die leichte Kette enthält das katalytische Zentrum, welches FXI proteolytisch aktiviert. Außerdem aktiviert α -FXIIa das dem FXI strukturell ähnelnde Präkallikrein zu Kallikrein, welches einerseits im Sinne einer positiven Feedback-Reaktion weiteres oberflächengebundenes FXII-Zymogen zu α -FXIIa spaltet und andererseits im Rahmen des Kallikrein-Kinin-Systems insbesondere bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt.

In weiteren Schritten kann Kallikrein α -FXIIa weiter proteolytisch spalten, sodass die schwere und die leichte Kette vollständig voneinander getrennt werden. Die leichte Kette mit dem katalytischen Zentrum wird dann als β -FXIIa bezeichnet. Zn^{2+} verstärkt diese Reaktion. Der nicht mehr oberflächengebundene β -FXIIa spielt eine größere Rolle innerhalb des Komplementsystems und ist nicht relevant für die Gerinnungsaktivierung (Schmaier, 2008).

α -FXIIa aktiviert das homodimere FXI-Zymogen, indem beide Untereinheiten nach Arginin 369 gespalten werden. Es entsteht jeweils eine schwere und eine leichte Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Es wird davon ausgegangen, dass α -FXIIa zunächst an eine Untereinheit bindet und im Sinne eines *trans*-Aktivierungsmechanismus die andere Untereinheit aktiviert. Dadurch entsteht 1/2-FXIa, der bereits eine schwache proteolytische Wirkung besitzt. Die Aktivierung der zweiten Untereinheit erfolgt daraufhin deutlich langsamer. Sind beide Monomere aktiviert, entfaltet FXIa die volle proteolytische Aktivität. Die Dimerstruktur scheint daher insbesondere für die FXIIa-induzierte Aktivierung relevant zu sein. Der genaue Mechanismus und die Bindungsstelle für α -FXIIa sind bislang noch nicht vollständig bekannt. Unter anderem wird davon ausgegangen, dass α -FXIIa an die A2-Domäne und A4-Domäne von FXI bindet. Die entsprechende Bindungsstelle innerhalb des FXIIa-Moleküls ist bislang ebenfalls nicht bekannt. Durch die Aktivierung von FXI kommt es zu einer Konformationsänderung des Moleküls, die zur

Freilegung der Bindungsstelle von FIX führt (Geng et al., 2013; Mohammed et al., 2018; Wu et al., 2008).

In vitro sind verschiedene negativ geladene Oberflächen in der Lage, durch den Kontakt mit Plasma eine Gerinnungsaktivierung hervorzurufen. Neben Glas, Polyethylen und Silikon ist Kaolin in der Lage, FXII zu aktivieren (Schmaier, 2008). Die Messmethode der PTT wurde durch die Zugabe von Kaolin modifiziert, wodurch sich die Gerinnungszeit deutlich verkürzte (Proctor und Rapaport, 1961). Weitere negativ geladene Moleküle wie Dextransulfat, Sulfatide oder Ellagsäure kamen zum Einsatz, um FXII in vitro zu aktivieren (Samuel et al., 1992; Tans et al., 1983). Aus der PTT wurde so die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) entwickelt, die weiter modifiziert noch heute in der Routinediagnostik als Gruppentest zur Untersuchung der intrinsischen Gerinnungsfaktoren eingesetzt wird (White, 2003).

In vivo wurden ebenfalls negativ geladene Oberflächen und Moleküle identifiziert, die zu einer Kontaktaktivierung führen können. Hierzu gehören unter anderem Gelenkknorpel, Haut, Fettsäuren, RNA, Kollagen, von aktivierten Thrombozyten sezerniertes Polyphosphat, Endotoxine, Amyloid und Heparin (Didiasova et al., 2018; Schmaier, 2008). Die Identität der physiologisch relevanten intravasalen Kontaktfläche ist jedoch bislang nicht abschließend geklärt.

1.2.2.2 Aktivierung von FXI durch Thrombin

Ebenso wie FXIIa spaltet auch Thrombin FXI nach Arginin 369 in beiden FXI-Monomeren. Im Gegensatz zur FXIIa-induzierten Aktivierung von FXI scheint die Dimerstruktur von FXI für die Aktivierung durch Thrombin weniger relevant zu sein. In vitro konnten sowohl FXI-Dimere als auch FXI-Monomere in Anwesenheit von Polyphosphaten nahezu gleich schnell durch Thrombin aktiviert werden (Geng et al., 2013). Diese Beobachtung legt nahe, dass Thrombin FXI durch einen anderen Mechanismus aktiviert als FXIIa. Die Bindungsstelle für unterschiedliche Thrombinformen (α -Thrombin, β -Thrombin, γ -Thrombin und Meizothrombin) wird in der A1-Domäne von FXI vermutet, welche innerhalb des Monomers einen engen Lagebezug zu der Proteasedomäne und Arginin 369 hat (Baglia und Walsh, 1996). Die homodimere Molekülstruktur von FXI scheint in vivo dennoch auch für die thrombininduzierte Aktivierung relevant zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass die A3-Domäne eines Monomers an GP-Ib der Thrombozyten bindet,

während die A1-Domäne des zweiten Monomers an Thrombin bindet (Sang et al., 2021). Auch während der thrombininduzierten Aktivierung von FXI entsteht zunächst 1/2-FXIa und anschließend FXIa, wobei insbesondere der erste Schritt langsamer abläuft als bei der Aktivierung durch FXIIa (Geng et al., 2013).

Die Aktivierung von FXI wird in Anwesenheit von Polyanionen beschleunigt, die nach aktuellem Kenntnisstand an die basischen Aminosäuresequenzen in der A3- und der Proteasedomäne von FXI binden (Mohammed et al., 2018). Während die FXI-Aktivierungsrate durch FXIIa um das 30-Fache beschleunigt wird, führen Polyphosphate zu einer Beschleunigung der thrombininduzierten Aktivierung um das bis zu 3000-Fache (Geng et al., 2013). Die im Vergleich geringe Verstärkung der FXIIa-induzierten FXI-Aktivierung durch Polyanionen kann dadurch erklärt werden, dass die negativ geladene Proteasedomäne von FXIIa bereits in Abwesenheit eines negativ geladenen Kofaktors eine stärkere Bindung mit dem positiv geladenen FXI-Molekül eingeht und dieses aktiviert (Pathak et al., 2015). Die Struktur von Thrombin unterscheidet sich hingegen stark von der Struktur der Proteasedomäne von FXIIa. Die an der FXI-Aktivierung mutmaßlich beteiligten Anionenbindungsregionen I und II (Exosite I und II) des Thrombins besitzen genau wie das FXI-Molekül eine positive Ladung (Yun et al., 2003). Ohne negativ geladenen Kofaktor, der die zwei Moleküle zueinander führt, erfolgt die Aktivierung von FXI durch Thrombin nur sehr langsam in einem Ausmaß, das nicht ausreichend zu sein scheint, um neben FXIIa als alternativer Aktivator von FXI zu fungieren. Der genaue Aktivierungsmechanismus durch Thrombin und die Identität des physiologisch relevanten Kofaktors sind bislang nicht geklärt (Mohammed et al., 2018).

1.2.2.3 Potenzielle Kofaktoren von Thrombin bei der Aktivierung von FXI

In vitro konnte eine verstärkte Aktivierung von FXI durch Thrombin in Anwesenheit verschiedener Polyanionen nachgewiesen werden. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, binden die Polyanionen sowohl FXI als auch Thrombin, die durch die geschaffene räumliche Nähe zueinander trotz gleicher Ladung leichter miteinander interagieren können. Für diesen Mechanismus benötigen die anionischen Polymere eine gewisse Mindestlänge.

In Anwesenheit von Dextransulfat wurde die Aktivierung um das bis zu 2000-Fache verstärkt (Gailani und Broze, 1991). Die physiologisch vorkommenden Polyanionen Heparin und Sulfatide führten zu einer deutlich schwächeren Aktivierung. Bei den getesteten Glykosaminoglykanen Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat sowie bei dem Einsatz von Phospholipidvesikeln konnte zunächst kein verstärkender Effekt nachgewiesen werden (Naito und Fujikawa, 1991). In einer anschließend durchgeführten Studie konnte in Anwesenheit von Heparin eine 60-fache Verstärkung der thrombininduzierten Aktivierung von FXI nachgewiesen werden. Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A und C führten hier zu einer deutlich schwächeren Verstärkung (Gailani und Broze, 1993). Sowohl unter Zugabe von Heparansulfat als auch von Dermatansulfat waren unphysiologisch hohe Thrombinkonzentrationen notwendig, um FXI zu aktivieren (Wuillemin et al., 1996b). Die bis dato identifizierten physiologisch vorkommenden Kofaktoren können somit nicht dem natürlichen intravasalen Kofaktor entsprechen. Diese Rolle wiederum könnten negativ geladene Polyphosphate übernehmen. In vitro konnten Polyphosphate mit einer Polymerlänge von über 50, die den von aktivierten Thrombozyten sezernierten Polyphosphaten mit einer Polymerlänge von 60 bis 100 entsprechen, die Aktivierung von FXI durch Thrombin um das bis zu 3000-Fache verstärken. Die maximale Verstärkung wurde allerdings bei Polymerlängen von über 100 erzielt (Choi et al., 2011; Geng et al., 2013). Mithilfe des Elektronenmikroskops wurden Polyphosphate mit einer größeren Polymerlänge an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten nachgewiesen. Ob diese zu einer relevanten Verstärkung der FXI-Aktivierung durch Thrombin führen, ist jedoch bislang unklar (Mohammed et al., 2018; Verhoef et al., 2017). Als weitere mögliche intravasale Kofaktoren kommen Nukleinsäuren in Frage, die nach einer Zellschädigung in die Blutbahn gelangen. Bislang konnte allerdings nur eine geringe Verstärkung der FXI-Aktivierung in Anwesenheit von DNA oder RNA um das 2- bis 3-Fache nachgewiesen werden (Ivanov et al., 2017). Alternativ könnte auch TF als essenzieller Mediator der Blutgerinnung nach einer Gefäßwandverletzung als Kofaktor dienen (Grover und Mackman, 2018).

1.2.2.4 Inhibitoren von FXIa

Die Aktivierung von FXI zu FXIa ist irreversibel. Zur Regulation der proteolytischen Aktivität von FXIa bedarf es in vivo potenter Inhibitoren, wobei aufgrund der Dimerstruktur jeweils zwei Inhibitormoleküle an ein FXIa-Molekül binden (Mannhalter, 1999). Inhibitoren von FXIa sind die im Plasma zirkulierenden SERPINE AT, C1-Inhibitor, α 1-Antitrypsin und α 2-Antiplasmin. Sie werden allesamt in der Leber synthetisiert und führen zu einer irreversiblen Hemmung von FXIa (Wuillemin et al., 1996a). Der Protein-Z-abhängige Proteaseinhibitor ist ein weiterer direkter FXIa-Inhibitor (Han et al., 2000). Zu den FXIa-Inhibitoren, die nicht frei im Plasma zirkulieren, gehören die Proteasen Nexin-1 und Nexin-2. Nexin-1 wird unter anderem in Thrombozyten und Endothelzellen gebildet und lässt sich an den Zelloberflächen nachweisen (Knauer et al., 2000). Nexin-2 wird von aktivierten Thrombozyten sezerniert (Navaneetham et al., 2005).

Ähnlich wie die Aktivierung kann auch die Inhibition von FXIa in Anwesenheit von Polyanionen verstärkt werden. Dabei binden die Polyanionen sowohl an die basischen Aminosäuresequenzen in der A3- und der Proteasedomäne von FXIa als auch an den Inhibitor (Emsley et al., 2010). So kann beispielsweise die Inhibition von FXIa durch AT oder C1-Inhibitor in Anwesenheit von Heparin um das bis zu 50-Fache gesteigert werden (Zhao et al., 1998).

1.2.3 Substrate von FXIa

Die Hauptfunktion von FXIa ist die Aktivierung von FIX in Anwesenheit von Ca^{2+} . FIX wird sowohl durch den TF/FVIIa-Komplex in Anwesenheit von Phospholipiden als auch Phospholipid-unabhängig durch FXIa aktiviert. In beiden Fällen wird FIX zunächst nach Arginin 145 gespalten, sodass das Intermediärprodukt FIX α entsteht. Anschließend erfolgt eine Spaltung nach Arginin 180, wodurch sich die enzymatisch aktive Form FIX $\alpha\beta$ bildet. Während der Aktivierung durch FXIa bindet FIX zunächst an die A3-Domäne und anschließend an das aktive Zentrum von FXIa (Mohammed et al., 2018).

In vitro konnten neben FIX weitere Substrate von FXIa identifiziert werden. So können FX, FV und FVIII in geringem Ausmaß durch FXIa aktiviert werden. Die Aktivierung von FX erfolgt Ca^{2+} -unabhängig. Eine verstärkte Aktivierung von FV wird in Anwesenheit von Polyphosphaten erreicht. In Tiermodellen wurde durch eine FXIa-induzierte Thrombingenerierung bei Mäusen mit einem FIX-Mangel gezeigt, dass FXIa auch in vivo

neben FIX weitere Komponenten der Gerinnungskaskade aktivieren kann (Matafonov et al., 2013).

Eine weitere prokoagulatorische Wirkung besitzt FXIa durch die Fähigkeit, TFPI zu hemmen. Dadurch wird die schnelle Inhibition des TF/FVIIa-Komplexes durch TFPI abgeschwächt und es werden größere Mengen Thrombin über das extrinsische System gebildet. Die Inaktivierung von TFPI wird dabei in der Anwesenheit von Polyphosphaten aus aktivierten Thrombozyten verstärkt (Puy et al., 2015; Puy et al., 2016b).

FXIa hat indirekt eine hemmende Wirkung auf die Fibrinolyse. Durch eine positive Rückkopplung führt FXIa zu einer Steigerung der Thrombingenerierung und somit zu einer verstärkten Aktivierung von TAFI durch Thrombin. TAFI spaltet die C-terminalen Lysinreste von Fibrinolyseprodukten ab, welche sonst im Sinne einer positiven Verstärkung Plasminogen und t-PA aktivieren. So kommt es zu einer verminderten Aktivierung der Fibrinolyse. Der Effekt der verstärkten Aktivierung von TAFI konnte auch noch nachgewiesen werden, nachdem sich bereits ein Gerinnsel gebildet hat. Dieser Zusammenhang zeigt, dass FXIa indirekt zu einer höheren Stabilität des Thrombus beiträgt. Insbesondere in Geweben mit hoher fibrinolytischer Aktivität wie dem Harntrakt, der Nasen- und Mundschleimhaut und den Tonsillen spielt diese indirekte antifibrinolytische Eigenschaft von FXIa eine größere Rolle (Borne et al., 1995; Borne et al., 2006). Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass FXIa wie sein Homolog Kallikrein über eine Aktivierung von FXII Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems aktiviert (Bane et al., 2016).

1.2.4 Klinische Bedeutung

Der Referenzbereich des FXI-Aktivitätsspiegels in menschlichem Plasma liegt etwa zwischen 80 und 140 % (Zantek et al., 2015). Es liegt die Vermutung nahe, dass eine FXI-Aktivität unterhalb dieser Norm zu einem erhöhten Blutungsrisiko und eine FXI-Aktivität oberhalb der Norm zu einem erhöhten Thromboserisiko führen können. Klinische Studien haben gezeigt, dass ein FXI-Mangel eine variable, relativ milde Blutungsneigung hervorruft (Ragni et al., 1985). Hingegen führen erhöhte FXI-Spiegel zu einem signifikant erhöhten Thromboserisiko (Yang et al., 2006).

1.2.4.1 Angeborener FXI-Mangel – Hämophilie C

Der angeborene FXI-Mangel wurde zuerst 1953 als moderate Blutungsneigung beschrieben. Er gehört zu den seltenen Gerinnungsstörungen. Die Inzidenz eines schweren FXI-Mangels liegt in der Allgemeinbevölkerung bei ungefähr 1:1.000.000. Er wird autosomal rezessiv vererbt und in Anlehnung an die Hämophilie A und B bei FVIII- bzw. FIX-Mangel auch Hämophilie C genannt. Anders als bei der Hämophilie A und B ist das Blutungsrisiko variabler und deutlich schwächer ausgeprägt. Ein Erklärungsansatz für die schwächere Blutungstendenz ist die Tatsache, dass FIX in vivo sowohl über den intrinsischen (FXIa) als auch über den extrinsischen Weg (TF/FVIIa-Komplex) aktiviert wird und sich eine verminderte intrinsische Aktivierung klinisch somit schwächer äußert als ein Mangel an FIX oder dessen Kofaktor FVIII. Die Variabilität des Blutungsrisikos, welches nicht mit der in vitro gemessenen FXI-Aktivität korreliert, kann bislang nicht hinreichend erklärt werden. Einflüsse auf die Variabilität werden in der individuellen Ausprägung der extrinsisch-prokoagulatorischen und der fibrinolytischen Aktivität vermutet (Wheeler und Gailani, 2016). In einer Studie mit Hämophilie-C-Patienten wurde nach TF-induzierter Gerinnungsaktivierung in vitro im Plasma der Patienten mit phänotypisch erhöhter Blutungsneigung mikroskopisch eine geringere Gerinnseldichte beobachtet als im Plasma asymptomatischer Patienten. In derselben Studie wurde festgestellt, dass die Patienten mit erhöhter Blutungsneigung in der Vorgeschichte geringfügig höhere TFPI-Plasmaspiegel hatten (Zucker et al., 2014). Klinische Beobachtungen zeigen, dass ein erhöhtes Blutungsrisiko insbesondere bei operativen Eingriffen oder Verletzungen an fibrinolytisch aktivem Gewebe besteht, was durch die indirekte antifibrinolytische Eigenschaft und somit gerinnselstabilisierende Wirkung von FXI erklärt wird (Borne et al., 1995). Zu spontanen Blutungen kommt es beim angeborenen FXI-Mangel nur selten (Santoro et al., 2015).

Insgesamt sind über 200 Mutationen des FXI-Gens bekannt, von denen vier gehäuft in bestimmten Populationen auftreten: Glu117stop bei Ashkenazi- und Iraki-Juden sowie bei Menschen arabischer Herkunft, Phe283Leu bei Ashkenazi-Juden, Cys38Arg bei Basken und Cys128stop bei Briten. Die Prävalenz des hereditären FXI-Mangels ist unter Ashkenazi-Juden am größten. Die Heterozygoten-Häufigkeit liegt in dieser Bevölkerungsgruppe bei 1:11 und die Homozygoten-Häufigkeit bei 1:450. Homozygote Allelträger haben FXI-Aktivitätspiegel von < 15 %, während heterozygote Allelträger

meistens normwertige oder auf zwischen 25 bis 70 % reduzierte FXI-Spiegel aufweisen (Seligsohn, 2009; Wheeler und Gailani, 2016). Selten kommt es durch Mutationen in der katalytischen Domäne (Gly400Val und Trp569Ser) intrazellulär zu einer Dimerisierung zwischen einem mutanten, nicht sezernierbaren FXI-Monomer und einem Wildtyp-FXI-Monomer, sodass die Sekretion des Wildtyp-FXI gehemmt wird. In diesem Fall spricht man von einem dominant vererbten FXI-Mangel, bei dem Heterozygote bis zu 50 % niedrigere FXI-Plasmaspiegel aufweisen (Kravtsov et al., 2004).

Bei den meisten Hämophilie-C-Patienten korreliert die FXI-Restaktivität mit der vorhandenen Antigenkonzentration im Plasma. Nur bei wenigen Patienten findet sich eine in Relation höhere Antigenkonzentration mit dysfunktionalem FXI. Lediglich sieben von über 200 bekannten Mutationen kodieren einen dysfunktionalen FXI (Seligsohn, 2009).

Bei hohem Blutungsrisiko wird eine FXI-Substitution erforderlich. Insbesondere vor einer geplanten Tonsillektomie oder Prostatektomie sollte bei schwerem FXI-Mangel das Blutungsrisiko beurteilt werden und gegebenenfalls eine prophylaktische Substitution erfolgen. Üblicherweise erfolgt die Substitutionstherapie durch Gefrorenes Frischplasma (GFP). Ebenfalls einsetzbar sind FXI-Konzentrate, bei deren Gabe im Gegensatz zu GFP keine Gefahr einer Volumenüberlastung besteht. Allerdings treten nach FXI-Konzentratgabe insbesondere bei älteren Patienten gehäuft Thrombosen auf (Bolton-Maggs, 2000; James et al., 2014). Aus diesem Grund sind FXI-Konzentrate aktuell in Deutschland nicht zugelassen (Bundesärztekammer, 2020). Ein Drittel aller Menschen mit schwerem FXI-Mangel entwickeln nach einer Exposition von Blutprodukten Antikörper gegen FXI, sodass zur Blutungsprävention statt GFP auch rekombinanter FVIIa (rFVIIa) eingesetzt werden kann (Seligsohn, 2009).

Neben der Substitutionstherapie gibt es weitere Möglichkeiten zur Prophylaxe und Therapie einer perioperativen oder perinatalen Blutung, die entweder bei geringerem Blutungsrisiko allein oder bei höherem Risiko ergänzend zu GFP zum Einsatz kommen können. Insbesondere bei Traumata an fibrinolytisch aktivem Gewebe, zum Beispiel im Rahmen einer Zahnextraktion, können Antifibrinolytika wie Tranexamsäure eingesetzt werden. Bei höherem Blutungsrisiko ist die Gabe von Antifibrinolytika auch schon prophylaktisch möglich (Bolton-Maggs, 2000). Bei mildem FXI-Mangel konnte in Einzelfällen eine Senkung der Blutungsinzidenz durch die Gabe von Desmopressin

beobachtet werden (Franchini et al., 2009). Bei einem lokal begrenzten Trauma kann zusätzlich Fibrinkleber eingesetzt werden (Bolton-Maggs, 2000).

1.2.4.2 Die Rolle von FXI bei der Thrombogenese

Im Gegensatz zu der moderaten Blutungsneigung beim angeborenem FXI-Mangel spielen erhöhte FXI-Antigenkonzentrationen in der Zirkulation eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Thrombosen. Insbesondere das Risiko eines ischämischen Schlaganfalls oder einer venösen Thrombose ist bei elevierten FXI-Spiegeln deutlich erhöht (Meijers et al., 2000; Yang et al., 2006). Bei Patienten mit angeborenem FXI-Mangel zeigen beide Krankheitsbilder eine reduzierte Inzidenz (Salomon et al., 2008; Salomon et al., 2011). Bislang ist unklar, ob das Risiko eines Myokardinfarktes bei elevierten FXI-Spiegeln signifikant erhöht ist. Verschiedene Studien erbrachten diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse (Key, 2014).

Eine Erklärung für die prokoagulatorische Wirkung von FXI wird in der Verknüpfung zwischen intrinsischem und extrinsischem Aktivierungsweg und deren Feedback-Verstärkung durch die thrombininduzierte FXI-Aktivierung vermutet (Puy et al., 2016a). Diese positive Rückkopplung führt durch die Aufrechterhaltung der Thrombingenerierung zu einer Größenzunahme und Stabilisierung des Thrombus (Borne et al., 1995).

Das thrombogene Potenzial von FXI macht ihn zu einem möglichen Ziel für eine medikamentöse Antikoagulation. Im Hinblick auf das einhergehende Blutungsrisiko scheint eine FXI/FXIa-inhibierende Therapie einigen herkömmlichen Antikoagulantien überlegen. Insbesondere zur perioperativen Prophylaxe venöser Thromboembolien (VTE) oder zur Schlaganfallprophylaxe bei Vorhofflimmern könnte die medikamentöse Inhibition von FXI in Zukunft eine größere Rolle spielen (Bickmann et al., 2017; Székely et al., 2019). Verschiedene Medikamente, die FXI auf unterschiedliche Art und Weise inhibieren, befinden sich aktuell in verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung. Eine Zulassung für eines dieser Medikamente gibt es bislang nicht (Székely et al., 2019). Ein Antisense-Oligonukleotid (ASO), welches durch die Bindung an mRNA die FXI-Synthese in der Leber reduziert, wurde erfolgreich am Menschen getestet. In einer klinischen Studie war das parenteral verabreichte FXI-ASO IONIS-416858 zur Prävention postoperativer venöser Thrombosen nach elektiver Knieoperation dem etablierten niedermolekularen Heparin Enoxaparin überlegen. (Büller et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit ist die Hemmung der FXI-Aktivierung oder des aktivierten FXIa durch monoklonale Antikörper, die spezifisch an FXI oder FXIa binden. Der Vorteil dieser Antikörper ist die lange Halbwertszeit, sodass eine monatliche subkutane Applikation genügen würde. Gleichzeitig müsste es jedoch auch ein Antidot im Falle einer schweren Blutung geben (Székely et al., 2019). Der FXI-Antikörper AB023 bindet spezifisch an die A2-Domäne von FXI, wodurch eine Aktivierung durch FXIIa verhindert wird (Lorentz et al., 2019). Der Antikörper BAY-1213790 (Osocimab) bindet allosterisch in der Nähe des aktiven Zentrums und inhibiert durch dessen Konformationsänderung die FXIa-Aktivität. Osocimab zeigte sich in einer klinischen Studie dem Enoxaparin zur Prävention postoperativer Thrombosen überlegen, wenn es präoperativ subkutan verabreicht wurde (Thomas et al., 2019; Weitz et al., 2020).

Neben ASO und Antikörpern gibt es eine dritte Gruppe möglicher FXI-Inhibitoren. Aptamere und andere kleine synthetische Moleküle werden oral verabreicht und hemmen FXIa entweder durch die Bindung an das aktive Zentrum oder durch allosterische Modulation. Die kurze Halbwertszeit dieser Moleküle könnte insbesondere in Akutsituationen von Vorteil sein. Das FXI-Inhibitormolekül BMS-986177 befindet sich aktuell in einer klinischen Studie zur Primärprophylaxe der postoperativen Thrombose und zur Sekundärprophylaxe des ischämischen Schlaganfalls (Perera et al., 2020; Székely et al., 2019). Eine indirekte Methode zur Inhibition der FXI-Aktivierung ist die Neutralisierung von Aktivatoren des Kontaktsystems. Im Tiermodell konnte durch die parenterale Gabe eines neutralisierenden Nukleinsäurefängers eine Thromboseprophylaxe ohne signifikant erhöhtes Blutungsrisiko erreicht werden (Jain et al., 2012).

1.2.5 Labordiagnostik von FXI

Die labordiagnostische Bestimmung von Gerinnungsparametern beruht üblicherweise auf dem Modell der klassischen Gerinnungskaskade, welche in vitro über das intrinsische oder das extrinsische System aktiviert wird. Als Screeninguntersuchung werden üblicherweise die aPTT und die Thromboplastinzeit (TPZ, Angabe in Deutschland als Quick-Wert) koagulometrisch bestimmt, welche bei einer plasmatischen Gerinnungsstörung eine erste differenzialdiagnostische Abgrenzung bezüglich der Komponenten des intrinsischen (aPTT) oder des extrinsischen Systems (TPZ) erlauben (Pötzsch und Madlener, 2010). Zur aPTT-Messung wird das in Citratröhrchen dekalzifizierte Plasma mit

oberflächenaktiven Substanzen, zum Beispiel Kaolin, in Anwesenheit von Phospholipiden inkubiert, sodass eine Aktivierung der Kontaktfaktoren ausgelöst wird. Nach Rekalzifizierung durch Zugabe von Calciumchlorid wird die Zeit bis zur Gerinnungsbildung koagulometrisch gemessen (Winter et al., 2017). Beeinflusst wird die aPTT durch die Gerinnungsaktivität der Kontaktfaktoren HMWK, Präkallikrein und FXII, sowie die Aktivitäten von FXI, FIX, FVIII, FX, FV, FII und der Fibrinogenkonzentration. Eine pathologisch verlängerte aPTT tritt bei einem Mangel der Einzelfaktoren, unter Therapie mit Heparin, direkten Thrombininhibitoren oder direkten FXa-Inhibitoren sowie bei Antiphospholipidantikörpern auf (Pötzsch und Madlener, 2010). Bei einem schwerem FXI-Mangel mit < 15 % Restaktivität ist die aPTT um das bis zu 2-Fache der Standardabweichung verlängert (Seligsohn, 2009). Um die Ursache einer verlängerten aPTT weiter abzuklären, werden die Aktivitäten der Einzelfaktoren bestimmt. Dies kann koagulometrisch oder amidolytisch erfolgen.

Zur koagulometrischen Aktivitätsbestimmung von FXI wird das zu untersuchende Plasma mit einem FXI-Mangelplasma verdünnt, sodass die FXI-Aktivität für die anschließende aPTT-Bestimmung zur limitierenden Größe wird. Anhand des Vergleichs der gemessenen Gerinnungszeit mit einer Standardkurve, die mit seriell verdünntem Normalplasma erstellt wurde, kann die FXI-Aktivität der Plasmaprobe anschließend in Prozent der Norm angegeben werden. Bei der amidolytischen Methode wird die Hydrolyserate eines zum Plasma zugegebenen FXI-spezifischen Peptidsubstrates photometrisch bestimmt, wodurch nicht nur eine Aktivitätsbestimmung anhand eines Vergleiches mit einer Standardkurve, sondern auch eine kinetische Analyse möglich ist. Allerdings wird bei dieser Methode lediglich die Funktion des aktiven Zentrums und nicht die Funktion des Gesamtmoleküls getestet (Pötzsch und Madlener, 2010).

Der beschriebene aPTT-Gruppentest führt bereits zu einer Gerinnungsbildung und somit zum Testende, wenn nur wenige Prozent des verfügbaren Thrombins gebildet wurden. Die nachfolgenden Prozesse bleiben unerkannt, obwohl diese einen genaueren Aufschluss über eine mögliche Blutungs- oder Thromboseneigung bieten können. Insbesondere das Ausmaß der FXIa-abhängigen Vervielfachung der Thrombinbildung wird mittels aPTT-Messung nicht erfasst (Wheeler und Gailani, 2016). Ein umfassenderes Bild des klinischen Phänotyps liefern In-vitro-Thrombingenerierungstests, bei denen der gesamte Thrombinbildungsprozess von der initialen Bildungsphase bis zur schluss-

endlichen Inaktivierung abgebildet wird. Eine etablierte Methode ist das Calibrated Automated Thrombogram (CAT), bei dem zunächst die Gerinnungskaskade durch die Zugabe von rekombinantem TF (rTF) und synthetischen Phospholipiden aktiviert wird. Das gebildete Thrombin spaltet anschließend ein fluorogenes Substrat. Anhand einer simultanen Messung von Thrombinkalibratoren in der gleichen Plasmaprobe können die mit Hilfe des Fluorometers gemessenen Fluoreszenzwerte direkt mit einer speziellen Software in Konzentrationen konvertiert, gegen die Zeit aufgetragen und als Thrombingenerierungskurve dargestellt werden. An dieser Thrombingenerierungskurve können verschiedene Parameter abgelesen werden. Zum Beispiel wird die Phase der verstärkten Thrombinbildung durch Feedback-Mechanismen innerhalb des Kurvenverlaufs abgebildet und somit die Konzentration und Funktion der Gerinnungsfaktoren FV, FVIII, FIX und FXI widerspiegelt. Außerdem erlaubt die Analyse des Kurvenverlaufs bis zu einem gewissen Grad eine Aussage über die Funktion der physiologischen Inhibitoren AT, PC, PS und TFPI. Darüber hinaus beeinflusst die Menge und Funktion der Thrombozyten den Kurvenverlauf. Ein Nachteil dieser Testmethode ist die hohe interindividuelle Varianz der Ergebnisse (Castoldi und Rosing, 2011; Hemker et al., 2002). In einer Studie mit Hämophilie-C-Patienten, die abhängig von dem Blutungsausmaß bei vorangegangenen Operationen in die zwei phänotypischen Untergruppen „Bluter“ und „Nicht-Bluter“ unterteilt wurden, konnte die individuelle Blutungsneigung anhand eines solchen Thrombingenerierungstests deutlich besser prognostiziert werden als durch die aPTT-abhängige Aktivitätsbestimmung (Pike et al., 2015). Eine weitere Methode zur quantitativen FXI-Messung besteht in Gerinnungstests mit inhibitorischen Antikörpern, bei denen die Verlängerung der Gerinnungszeit nach Inhibition von FXI oder FXIa gemessen wird und mit einer Kalibrierungskurve verglichen wird (Butenas et al., 2008).

1.3 Vorarbeiten zur Untersuchung der Gerinnungsaktivierung in vivo

In der vorliegenden Arbeit wurde die In-vivo-Aktivierung von FXIa untersucht. Ein Fokus der In-vivo-Experimente war auf die Beziehungen zwischen der FXIa- und der Thrombingenerierung gerichtet, die, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, nicht vollständig geklärt sind. Nachfolgend sollen daher relevante Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe der Verfasserin zur Methodik der Bestimmung aktiven Thrombins in Plasma und deren Anwendung zur Untersuchung der Gerinnungsaktivierung in vivo kurz erläutert werden.

1.3.1 Bestimmung von Thrombin mittels Oligonucleotide-based Enzyme Capture Assay (OECA)

In vivo unterliegen aktivierte Gerinnungsfaktoren wie Thrombin einer raschen Inaktivierung durch endogene Inhibitoren. Eine zuverlässige Methode zur präanalytischen Stabilisierung der frei zirkulierenden aktivierten Gerinnungsfaktoren war lange Zeit nicht etabliert (Müller et al., 2011).

Eine häufig angewandte alternative Methode zum Nachweis einer in vivo stattgehabten Thrombingenerierung ist die Bestimmung des während des Aktivierungsprozesses abgespaltenen Prothrombinfragmentes 1+2 (F1+2) und des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT). Diese indirekten Thrombinbildungsmarker lassen sich aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit leichter bestimmen als freies Thrombin. Allerdings spiegeln sie nicht die exakte Kinetik der Thrombinbildung wider. Ihre quantitative Messung beruht auf einem antikörperbasierten Nachweisverfahren mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Green et al., 2010; Nakamura et al., 1997).

Die direkte quantitative Messung der in vivo gebildeten Thrombinkonzentration gelang 2011 mit der Entwicklung des OECA. Nach der Blutentnahme verhindert der im Citrat-Blutentnahmeröhrchen vorgelegte reversible Thrombininhibitor Argatroban die Inaktivierung von Thrombin durch endogene Inhibitoren. Anschließend wird das Thrombin hochselektiv durch ein thrombinspezifisches DNA-Aptamer fixiert, wobei die Funktionalität des aktiven Zentrums nach anschließender Entfernung des Argatrobans durch mehrere Waschschriffe erhalten bleibt. Die quantitative Bestimmung des funktionell aktiven Thrombins erfolgt dann anhand der Proteolyserate eines fluorogenen Peptidsubstrates (Müller et al., 2011).

Aptamere sind kurze Oligonukleotide oder Peptide, die spezifisch an unterschiedlichste organische und anorganische Moleküle binden können. Sie bieten eine gleichwertige Alternative zu den bis dato in verschiedenen Gerinnungstests eingesetzten Antikörpern mit dem Vorteil einer höheren Stabilität und kostengünstigeren Produktion bei gleicher Affinität zum Zielmolekül. Dadurch ist die Voraussetzung eines breiten Einsatzes in klinischen Standardtests gewährleistet (Song et al., 2012).

1.3.2 Untersuchungen zur perioperativen oder durch rFVIIa induzierten Gerinnungsaktivierung

Mit dem Thrombin-OECA gelang es in einer klinischen Studie erstmals, die Dynamik der Bildung freien Thrombins während einer elektiven Operation (OP) direkt zu messen (Müller et al., 2011). In einer Folgestudie mit größerer Population wurde die In-vivo-Aktivierungskinetik mehrerer prokoagulatorischer und antikoagulatorischer Parameter analysiert. Dabei wurde untersucht, inwiefern ein lokales Trauma im Rahmen verschiedener elektiver OPs eine systemische Gerinnungsreaktion hervorruft. Im Mittelpunkt dieser Studie stand der direkte quantitative Nachweis von in vivo gebildetem Thrombin mithilfe des OECA. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der indirekten Thrombinbildungsmarker TAT und F1+2 mittels ELISA gemessen. Zum Nachweis einer fibrinolytischen Aktivität wurden die D-Dimere bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die chirurgischen Traumata zu einer gesteigerten, jedoch ausgeglichenen systemischen Aktivierung der Thrombinbildung und der Fibrinolyse führten (Friedrich et al., 2018).

In anderen Studien erfolgte die Messung aktivierter Gerinnungsparameter vor und nach einer Aktivierung des extrinsischen Systems durch die intravenöse Gabe von niedrig-dosiertem rFVIIa. Auch in diesem als Stimulated Hemostasis Activity Pattern Evaluation (SHAPE) bezeichneten Ansatz konnte eine durch rFVIIa induzierte gesteigerte Thrombinbildung in vivo nachgewiesen werden (Rühl et al., 2018; Rühl et al., 2019).

Um die Plasmakonzentration von FXIa in vivo zu bestimmen, wurden in bisherigen Studien anderer Arbeitsgruppen meistens Gerinnungstests mit inhibitorischen Antikörpern oder In-vitro-Thrombingenerierungstests durchgeführt. So konnten insbesondere die Plasmakonzentrationen des in vivo generierten FXIa bei Traumapatienten (Prior et al., 2017; Prior et al., 2019) und bei Patienten mit atherothrombotischen Ereignissen bestimmt werden (Butenas et al., 2008; Loeffen et al., 2014; Loeffen et al., 2016; Undas et al., 2012). Allerdings fehlt in diesen Studien ein Bezug zu den jeweiligen FXIa-Ausgangswerten vor Eintritt des Ereignisses, sodass eine Aussage bezüglich der Dynamik der FXIa-Generierung nur sehr eingeschränkt möglich ist.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XI (FXI) ist ein Prozess, der sowohl bei der physiologischen Hämostase als auch in der Pathophysiologie der Thrombusbildung eine Rolle spielt. Die klinische Relevanz des aktivierten Gerinnungsfaktors XI (FXIa) wird etwa durch die milde Blutungsneigung von Patienten mit angeborenen Mangelzuständen (Hämophilie C) oder die Wirksamkeit von gegen FXIa gerichteten antithrombotischen Medikamenten deutlich. Aus In-vitro-Untersuchungen weiß man, dass FXI durch den (physiologisch nicht relevanten) Weg der Kontaktaktivierung oder – in Gegenwart eines Kofaktors – durch das zentrale Gerinnungsenzym Thrombin aktiviert werden kann. Der genaue Ablauf der FXIa-Bildung in vivo ist derzeit nicht vollständig verstanden, insbesondere ist die Identität des physiologischen Kofaktors bei der thrombininduzierten Aktivierung nicht geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der FXI-Aktivierung in vivo. Der Gang der Untersuchung gliederte sich dabei in drei Schritte bzw. Unterziele:

- 1) Erstes Unterziel der Arbeit war die Entwicklung einer laboranalytischen Methode zur Quantifizierung von FXIa in Blutplasma. Besondere Herausforderungen bei der Entwicklung einer solchen Messmethode stellten das in vivo stets in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegende Proenzym FXI als Störgröße und die rasche Elimination des FXIa durch endogene Inhibitoren im Plasma dar.
- 2) Zweites Unterziel war, als Zwischenschritt vor einer Bestimmung von in vivo gebildetem FXIa, die Untersuchung von in vitro generiertem FXIa mit dem zuvor entwickelten Test. Hierbei sollte insbesondere dessen Eignung untersucht werden, sowohl durch Kontaktaktivierung als auch durch die thrombininduzierte Aktivierung gebildeten FXIa zu bestimmen.
- 3) Im abschließenden Schritt der Untersuchung sollte die Bildung von FXIa in zwei verschiedenen klinischen Szenarien der Gerinnungsaktivierung untersucht werden, zum einen nach Gabe des Gerinnungsaktivators rFVIIa, zum anderen im Rahmen chirurgischer Eingriffe. In beiden Szenarien ist die vermehrte Bildung von Thrombin gut belegt. Die Hypothese im Rahmen der vorliegenden Arbeit war, dass diese Thrombinbildung eine vermehrte Bildung von FXIa auslöst, die durch den zuvor entwickelten Test in ihrer Dynamik quantifiziert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland:

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl_2)

KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland:

Natronlauge (NaOH) 1 mmol/l

Salzsäure (HCl) 1 mmol/l

Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland:

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Magnesiumchlorid-Dihydrat (MgCl_2)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland:

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

Tris-HCl 1 mmol/l (pH 8,0)

2.2 Verwendete Reagenzien

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland:

Streptavidin ultrapure

Bachem AG, Bubendorf, Schweiz:

Fluorogenes FXIa-Peptidsubstrat I-1575 (Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC)

Fluorogenes Thrombin-Peptidsubstrat I-1560 (Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC)

CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland:

Human α -Thrombin

Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark:

Polyclonal rabbit anti-sheep antibody PO163 HRO

Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland:

Aqua dest. (Ampuwa®)

Haematologic Technologies, Essex Junction, VT, USA:

Corn trypsin inhibitor (CTI)

Human FXIa

Monoclonal anti-human FXI antibody AHXI-5061

Polyclonal sheep anti-human FXI antibody PAHFXI-SAP

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland:

Dynabeads M-280 Streptavidin

Microsynth AG, Balgach, Schweiz:

HD1-22 3'biotinyliertes Aptamer (single-stranded DNA)

Mitsubishi Tanabe Pharma GmbH, Düsseldorf, Deutschland:

Argatroban (Argatra®)

Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark:

rFVIIa (NovoSeven®)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland:

Benzamidin

Bovines Serumalbumin (BSA)

BSA-Biotin

Dextransulfat

Heparansulfat

Polyphosphate p30, p45 und p70

Tween 20

Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland:

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

2.3 Verwendete Test-Kits

Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:

Immobilon™ Western

Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Deutschland:

BCS®-XP-Reagenzien (Actin® FS, Batroxobin-Reagenz, Berichrom® Antithrombin III, Berichrom® Protein C, INNOVANCE® D-Dimer, INNOVANCE® Free Protein S Ag, Innovin®, Mangelplasma Faktor II, Mangelplasma Faktor VII, Mangelplasma Faktor XI) Enzygnost® (F1+2 monoclonal, TAT micro)

Stago GmbH, Asnières sur Seine, Frankreich:

Staclot® VIIa-rTF

Thrombinoscope®, Maastricht, Niederlande:

CAT-Assay (Thrombinkalibrator, FluCa-Kit)

2.4 Verwendete Pufferlösungen

1-fach PBS (Phosphate-buffered Saline), pH 7,4:

137 mmol/l NaCl

2,7 mmol/l KCl

9,6 mmol/l Na₂HPO₄

1,5 mmol/l KH₂PO₄

Doppelt destilliertes Wasser

Aptamerpuffer, pH 7,4:

1-fach PBS
3 mmol/l MgCl₂
0,1 % BSA

Beschichtungspuffer, pH 9,0:

30 mmol/l Na₂CO₃
200 mmol/l NaHCO₃
Doppelt destilliertes Wasser

Blockpuffer, pH 7,4:

1-fach PBS
2 % BSA
0,05 % Tween

PBS-Waschpuffer, pH 7,4:

1-fach PBS
3 mmol/l MgCl₂
0,05 % Tween

Stopplösung, pH 7,4:

1-fach PBS,
200 mmol/l Benzamidin
50 mmol/l Natriumcitrat
0,1 % BSA

TBS-Substratpuffer (Tris-buffered Saline), pH 8,5:

140 mmol/l NaCl
10 mmol/l TrisHCl

Probenverdünnungspuffer, pH 7,4:

1-fach PBS

100 mmol/l Benzamidin

25 mmol/l Natriumcitrat

0,1 % BSA

2.5 Verwendete Materialien

Axygen Scientific, Union City, CA, USA:

PlateMax[®] Polyesterklebefolie für 96-Well Mikrotiterplatte

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland:

Vasofix Safty[®] Venenverweilkanüle, 21G

Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland:

1-Kanal-Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 0,5-5 ml)

8-Kanal-Pipetten (10-100 µl, 30-300 µl)

epT.I.P.S.[®] Pipettenspitzen

Reagiergefäße (1,5 und 2 ml)

Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich:

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:

Polyvinylidendifluorid-Membran

Nunc A/S, Roskilde, Dänemark:

Maxisorp Fluoronunc 96-Well Mikrotiterplatte (weiß)

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland:

Safety-Multifly[®]-Kanüle, 21G

S-Monovette[®] Gerinnungsanalytik 5 ml

2.6 Verwendete Geräte

Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland:

Chemilumineszenzdetektor ChemiDoc MP Imaging System

Elektrophorese-Zelle Mini-PROTEAN® Tetra System

BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland:

Automatischer Microplate-Washer ELx50

Plattenfluorometer FLx 800

Cenco Instrumenten B.V., Breda, Niederlande:

Vortex-Gerät

Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland:

Kühlzentrifuge 5810 R

Thermomixer comfort 5355

Tischzentrifuge 5804

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgweder, Deutschland:

Wasserbad GLF

Metrohm Deutsche GmbH & Co, Filderstadt, Deutschland:

pH-Meter 744

Mettler- Toledo GmbH, Gießen, Deutschland:

Digitalwaage, Modell PL1200

Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland:

Fluoroskan Ascent FL

Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland:

BCS®-XP Gerinnungsanalyser

2.7 Angewandte Methoden

In den folgenden Kapiteln werden nach einer kurzen Einführung in die Grundlagen antikörperbasierter Nachweisverfahren zunächst die im Rahmen dieser Arbeit neu- und weiterentwickelten Methoden erläutert. Anschließend wird die Anwendungsweise der genutzten kommerziell erhältlichen Tests beschrieben.

2.7.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzymimmunoassays (EIA) sind antikörperbasierte Nachweisverfahren, welche auf einer enzymatischen Reaktion beruhen. Mit diesen Verfahren können Analysate wie Proteine, Viren und niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine durch die Bindung an Antikörper nachgewiesen werden. Eine häufig verwendete Form des EIA ist der ELISA. Bei dieser Methode wird das nachzuweisende Antigen zunächst entweder selbst an die Polystyroloberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert oder mittels eines an der Oberfläche fixierten spezifischen Liganden als Fänger – meist ein Antikörper (Capture-Antikörper) – dort gebunden (Sandwich-ELISA).

Anschließend bindet ein Enzym-gekoppelter Antikörper entweder direkt als primärer Detektionsantikörper an das fixierte Analysat selbst oder indirekt als Sekundärantikörper an einen primären ungekoppelten Detektionsantikörper. Dabei unterscheiden sich die Bindungsstellen des ersten Capture-Antikörpers und des zweiten Detektionsantikörpers am Antigen. Das Enzym führt zu einer Reaktion eines in den Reaktionsansatz hinzugegebenen chromogenen oder fluorogenen Substrates, sodass durch die anschließende Extinktions- oder Intensitätsmessung mit dem Photometer und den Vergleich mit einer parallel gemessenen Verdünnungsreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen als Kalibrierungskurve eine Konzentrationsbestimmung des in der Probe enthaltenen Antigens möglich ist (Aydin, 2015; Engvall und Perlmann, 1971). Das Prinzip des direkten und indirekten ELISA ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

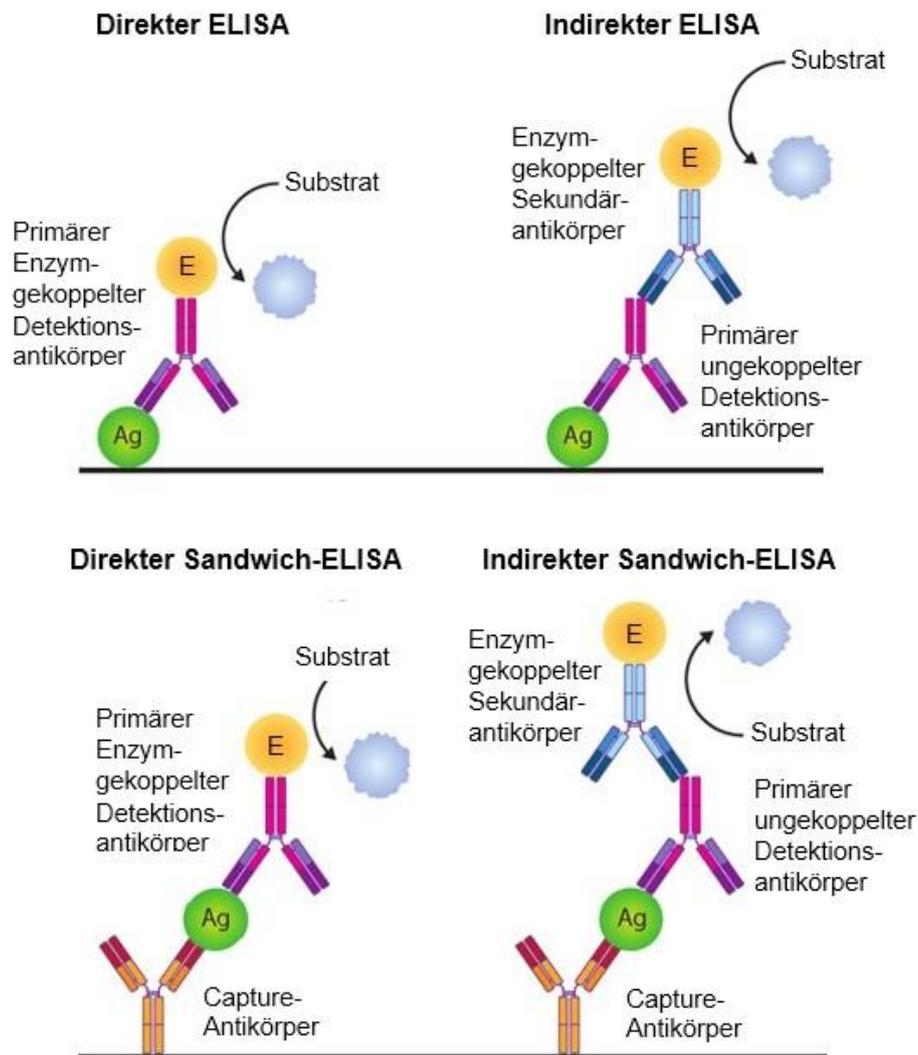


Abb. 5: Verschiedene Varianten des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)
 Direkter ELISA: Ein Enzym-gekoppelter Detektionsantikörper bindet an das an der Oberfläche fixierte Antigen. Indirekter ELISA: Ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den ungekoppelten Detektionsantikörper, welcher an das an der Oberfläche fixierte Antigen gebunden ist. Direkter oder indirekter Sandwich-ELISA: Das Antigen wird zunächst durch einen Capture-Antikörper fixiert. E, Enzym; Ag, Antigen (Modifiziert übernommen aus Salazar et al., 2017).

2.7.2 Enzyme Capture Assay (ECA) zur Bestimmung von aktiviertem FXI

Der ECA gehört in die Kategorie der Immunoassay-Verfahren und ist eine Variante des ELISA. Da es sich bei dem Analysat FXIa um ein Enzym handelt, kann der Nachweis hier direkt mittels eines fluorogenen Substrates ohne die Verwendung eines Enzym-gekoppelten Detektionsantikörpers erfolgen.

Im folgenden Absatz wird die final etablierte Methode des FXIa-ECA detailliert beschrieben. Die Methodenetablierung wird in Kapitel 3.1 erläutert.

Zunächst wurden alle Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte mit 4 µg/ml des monoklonalen Maus-Anti-Human-FXI-Antikörpers AHXI-5061 in Beschichtungspuffer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Platten wie auch bei allen nachfolgend beschriebenen Inkubationen durch eine Polyesterklebefolie versiegelt und im Dunkeln gelagert. Für den anschließenden Waschvorgang wurden die Wells mithilfe eines automatischen Microplate-Washers dreimal mit 300 µl PBS-Waschpuffer gespült. Nach dem Waschen wurden die Wells mit je 200 µl Blockpuffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das darin enthaltene BSA verhinderte dabei eine spätere unspezifische Bindung von anderen Probeninhaltsstoffen an die Plattenoberfläche. Wenn sie nicht unmittelbar anschließend für den ECA verwendet wurden, wurden die beschichteten Platten nach Absaugen des Blockpuffers bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Zur Durchführung des FXI-ECA wurden jeweils 100 µl der Plasmaproben oder FXIa-Kalibratoren in die Wells gegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:10 gemessen, bei der das inaktive Zymogen FXI die FXIa-Messungen nicht beeinflusst. Als Probenverdünnungspuffer diente PBS mit 1 mg/ml BSA, 100 mmol/l Benzamidin und 25 mmol/l Natriumcitrat. Die Kalibratoren mit FXIa-Konzentrationsintervallen einer geometrischen Verdünnungsreihe von 0 bis 20 ng/ml (0 bis 125 pmol/l) wurden in einer den Proben entsprechenden Matrix hergestellt und mit Benzamidin (100 mmol/l Endkonzentration) versetzt, um eine Inaktivierung von FXIa während der Inkubation und Messung zu verhindern. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Proben und Kalibratoren mittels einer 8-Kanal-Pipette aus den Wells entfernt. Hierbei wurden für jede Spalte frische Pipettenspitzen verwendet, um eine Kontamination durch Übertragung von Probenmaterial zu verhindern. Anschließend wurden 250 µl Waschpuffer manuell in die Wells gegeben und ebenfalls mit der 8-Kanal-Pipette und frischen Spitzen wieder entfernt. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend 100 µl des fluorogenen FXIa-spezifischen Peptidsubstrates, welches aus einer Aminosäurekette und dem fluorogenen Farbstoff 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) besteht (Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC, 100 µmol/l in Waschpuffer), in die Wells gegeben. Durch die FXIa-induzierte Spaltung des Substrates wird der Indikator freigesetzt und kann fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 360$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 460$ nm

gemessen werden. Zunächst wurde unmittelbar nach Substratzugabe die Basisfluoreszenz gemessen. Nach zwei Stunden erfolgte eine erneute Fluoreszenzmessung, wobei der Betrag der Fluoreszenzemissionszunahme bei Vorliegen eines Substratüberschusses proportional zur in einem Well vorhandenen FXIa-Menge war (Endpunktmessung). Die von den Kalibratoren erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden durch eine 4-Parameter-Kurvenfunktion interpoliert und diese Standardkurve zur Berechnung der FXIa-Konzentrationen in den Proben verwendet. Bei Messung jeder Probe im Dreifachansatz wurde abschließend der Mittelwert der gemessenen FXIa-Konzentrationen ermittelt.

2.7.3 Generierung von FXIa und Thrombin in vitro

In In-vitro-Experimenten sollte zunächst getestet werden, ob sich der neu entwickelte FXIa-ECA für die Messung von FXIa sowohl nach Kontaktaktivierung als auch nach einer Aktivierung von FXI durch Thrombin eignet. Dazu wurde FXI in Citratplasma auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert und anschließend die FXIa-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FXIa-ECA gemessen.

Für die In-vivo-Experimente, bei denen die Korrelation zwischen der Thrombin- und FXIa-Bildungsrate untersucht werden sollte, wurden außerdem In-vitro-Thrombingenerierungstests durchgeführt, um zu belegen, dass die zur Gerinnungsaktivierung eingesetzte rFVIIa-Dosis eine für die Aktivierung von FXI ausreichend hohe Thrombinbildung in vivo induziert.

2.7.3.1 rFVIIa-induzierte Thrombingenerierung in vitro

Die In-vitro-Thrombingenerierung wurde mit dem kommerziell erhältlichen CAT-Assay (Thrombinoscope®) gemessen, wobei das Startreagenz modifiziert wurde. Statt rTF wurde rFVIIa zur Aktivierung der Gerinnungskaskade eingesetzt. Die übrigen Reagenzien kamen standardmäßig zum Einsatz. Alle In-vitro-Thrombingenerierungstests wurden in plättchenreichem Plasma (PRP) durchgeführt, dessen Herstellung weiter unten beschrieben wird.

Die Thrombingenerierungskurven wurden anhand von vier Parametern ausgewertet (Abb. 6): „Lag time“ bezeichnet die Zeit bis die Thrombinkonzentration nach der Gerinnungsaktivierung erstmalig über dem Ausgangswert liegt. „Time to peak“ gibt die

Zeit bis zur maximalen Thrombinkonzentration an. Die maximale Thrombinkonzentration wird als „Thrombin-Peak“ bezeichnet. Die „Area Under the Curve“ (AUC) beschreibt die Gesamtmenge an gebildetem Thrombin und wird auch als endogenes Thrombinpotenzial (ETP) bezeichnet.

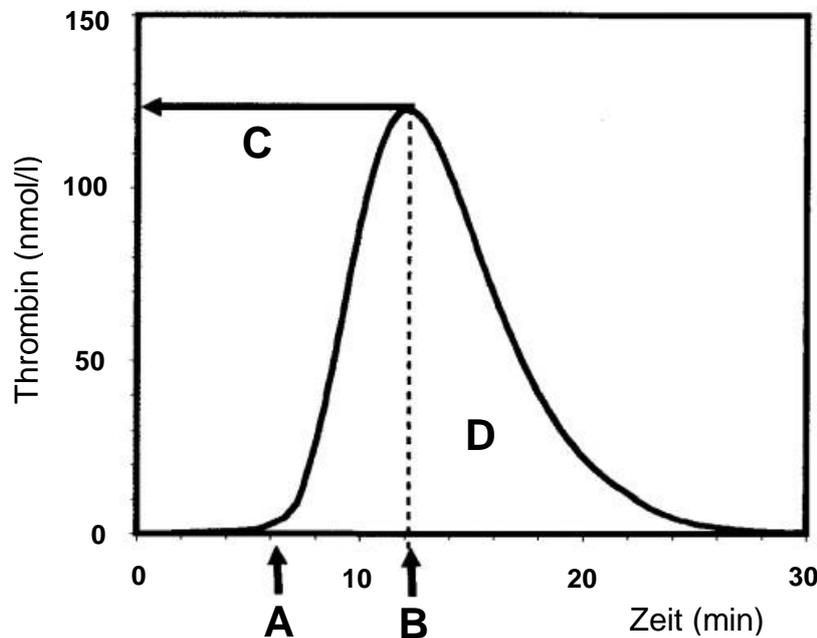


Abb. 6: Beispiel einer mittels Calibrated Automated Thrombogram (CAT) erstellten In-vitro-Thrombingenerierungskurve

A: Verzögerungszeit bis zum Anstieg der Thrombinkonzentration (Lag time); B: Zeit bis die maximale Thrombinkonzentration erreicht wird (Time to peak); C: Maximale Thrombinkonzentration (Thrombin-Peak); D: Area Under the Curve (AUC) entspricht dem endogenen Thrombinpotenzial (ETP) (Modifiziert übernommen aus Hemker et al., 2006).

In vivo sollte die intravenöse Gabe von rFVIIa zu einer ausreichend hohen Thrombinkonzentration führen, um bei den Probanden potenziell messbar erhöhte FXIa-Spiegel durch eine thrombininduzierte FXI-Aktivierung auszulösen. Mittels CAT-Assay sollte zuvor ermittelt werden, ob eine rFVIIa-Dosierung von 15 µg/kg hierfür ausreicht. In vorherigen Studien wurde 10 Minuten nach intravenöser Gabe von rFVIIa eine rFVIIa-Plasmakonzentration von 0,25 µg/ml gemessen (Rühl et al., 2018; Rühl et al., 2019). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die In-vitro-Thrombingenerierung mit rVIIa-Konzentrationen zwischen 0,25 und 32 µg/ml induziert.

Zunächst wurden in einer Mikrotiterplatte alle Wells der Testansätze mit 20 µl der verschiedenen rFVIIa-Verdünnungsstufen (in Tris-HCl) und alle Wells der Kalibratoransätze mit 20 µl des an α_2 -Makroglobulin gebundenen Thrombinkalibrators

befüllt. Die Bindung an α_2 -Makroglobulin verhindert eine Gerinnungsaktivierung und die Inaktivierung von Thrombin durch endogene Inhibitoren während der Messung. Anschließend wurden 80 μ l PRP in jedes Well pipettiert. PRP mit einer Thrombozytenzahl von 150.000/ μ l wurde hergestellt, indem plättchenreiches und plättchenarmes gepooltes Plasma gemischt wurden. Das Plasma wurde durch Zentrifugieren von Vollblut in Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI, ein Inhibitor der Kontaktaktivierung) enthaltenden Citratröhrchen (10,5 mmol/l Citrat, 20 μ g/ml CTI) mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 1500 g für 2 Minuten (plättchenreich), beziehungsweise von 2600 g für 10 Minuten (plättchenarm) gewonnen.

Die mit den Proben befüllte Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C in der Messkammer des Fluorometers (Fluorocan Ascent FL) inkubiert. Daraufhin wurden Thrombinbildung und -messung durch die automatisierte Zugabe von 20 μ l des im Test-Kit enthaltenen „FluCa“-Puffers initiiert. Der FluCa-Puffer enthielt anstelle des vom Hersteller vorgesehenen rTF rFVIIa in Konzentrationen, die im Reaktionsgemisch zu Endkonzentrationen von 0,25 bis 32 μ g/ml bezogen auf das eingesetzte Plasmavolumen führten. Während 120 Minuten Messzeit wurde das Fluoreszenzsignal in Intervallen von 20 Sekunden gemessen. Die Kalibratoren lieferten einen kontinuierlichen Umsatz des fluorogenen Peptidsubstrates, sodass die inneren Filtereffekte der Ansätze und der Substratverbrauch kalkuliert und die Fluoreszenzwerte der Proben durch die Thrombinoscope[®]-Software entsprechend korrigiert in Konzentrationen umgerechnet werden konnten. Anhand der erhaltenen Thrombingenerierungskurven konnten die oben genannten vier Parameter ermittelt und bei Messung jeder Probe im Dreifachansatz die entsprechenden Mittelwerte berechnet werden.

2.7.3.2 FXI-Aktivierung in vitro

Die Aktivierung von FXI erfolgte einerseits via Kontaktaktivierung durch die Zugabe eines aPTT-Reagenzes (Actin[®] FS) zu Citratplasma bei 37 °C in einem Verhältnis von 1:5. Um in diesem Versuchsansatz einen Einfluss von Thrombin auf die FXIa-Generierung auszuschließen, wurde das Plasma nicht rekalkifiziert. Um andererseits eine thrombin-induzierte FXIa-Generierung auszulösen, wurde eine Startlösung mit humanem α -Thrombin und Dextransulfat (in PBS, 1 mg/ml BSA) im Verhältnis 1:5 zu dem Citratplasma zugegeben. Dabei betrug die Endkonzentration von Dextransulfat 5 μ g/ml

und von Thrombin entweder 5 µg/ml (136 nmol/l) oder 500 ng/ml (13,6 nmol/l) im Reaktionsgemisch. Bei allen FXIa-Generierungsexperimenten mit Thrombin wurde das Plasma zunächst durch die Zugabe von Reptilase (Batroxobin-Reagenz) in einem Verhältnis von 1:10 für eine Stunde bei 37 °C defibriert. In insgesamt 16 vordefinierten Zeitintervallen zwischen 0 und 120 Minuten wurden den bei 37 °C inkubierten Reaktionsgemischen Aliquots entnommen und die FXIa-Generierung darin durch die Zugabe zu einer in Eppendorf-Reagiergefäßen zu gleichen Volumina (1:1) vorgelegten Stopplösung (PBS, 1 mg/ml BSA, 200 mmol/l Benzamidin, 50 mmol/l Natriumcitrat, pH 7,4) gestoppt. Unmittelbar anschließend wurden die Aliquots 1:4 in Probenverdünnungspuffer weiter verdünnt, um die für den FXIa-ECA erforderliche 1:10-Verdünnung des Citratplasmas zu erreichen. Die bereits verdünnten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert oder, wenn der FXIa-ECA nicht unmittelbar anschließend durchgeführt wurde, bei -40 °C gelagert.

Die In-vitro-Aktivierung von FXI wurde sowohl in normalem Poolplasma (NPP) als auch in FXI-Mangelplasma untersucht. NPP wurde durch Mischen gleicher Volumina von Citratplasmen, die von fünf gesunden Spendern gewonnen wurden, hergestellt. Der FXI-Aktivitätsspiegel in NPP betrug 98 %. FXI-Mangelplasma wurde von sieben Hämophilie-C-Patienten aus dem Hämophiliezentrum des Universitätsklinikums Bonn erhalten.

2.7.3.3 Western Blot

Die Western-Blot-Analyse sollte bestätigen, dass die Ergebnisse des FXIa-ECA tatsächlich die Aktivierung von FXI durch Thrombin in Gegenwart von Dextransulfat repräsentierten, d.h. dass das eingesetzte Dextransulfat tatsächlich als Kofaktor des Thrombins bei der Aktivierung von FXI wirkt. Dazu wurden Reaktionsansätze mit FXI, Thrombin und Dextransulfat mit jeweiligen Endkonzentrationen von 40 µg/ml in PBS 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Benzamidin in einer Endkonzentration von 100 mmol/l zugegeben. In entsprechenden Konzentrationen und Volumina wurden zusätzlich Referenzproben mit FXI, FXIa, Thrombin oder Dextransulfat erstellt. Bei 95 °C wurden die Proben zu gleichen Volumina (1:1) in Natriumdodecylsulfat-Puffer (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) mit 2 % Natriumdodecylsulfat und 5 % β-Mercaptoethanol inkubiert und danach auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben und ein Größenmarker einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen. Die so

nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran überführt. Der Chemilumineszenz-basierte Nachweis von FXI und FXIa erfolgte durch das Auftragen des primären polyklonalen Sheep-Anti-Human-FXI-Antikörpers (PAHFXI-SAP, Konzentration im Inkubationspuffer 1 µg/ml) und eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörpers (PO163-HRO, 0,65 µg/ml) auf die Membran. Nach Auftragen eines luminophoren Substrates (Millipore Immobilon™) konnte die Emission sichtbar gemacht werden.

2.7.4 Thrombin- und FXIa-Bildung in vivo

In der vorliegenden Arbeit wurde die FXIa-Bildung in vivo in zwei bereits beschriebenen klinischen Szenarien der In-vivo-Gerinnungsaktivierung untersucht, nämlich im Rahmen operativer Eingriffe und nach intravenöser Gabe von rFVIIa. In beiden Szenarien wurde in vorherigen Studien bereits eine vermehrte Thrombinbildung nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die FXIa-Spiegel in diesen zwei klinischen Szenarien mittels FXIa-ECA bestimmt.

2.7.4.1 Probandenrekrutierung und Probengewinnung in der SHAPE-Kohorte

Erhöhte FXI-Spiegel stellen einen Risikofaktor für VTE dar (Meijers et al., 2000). Neben der Analyse der FXIa- und Thrombingenerierungskinetik nach intravenöser Gabe von rFVIIa bei gesunden Probanden wurde daher zusätzlich untersucht, ob Probanden mit bekannter erhöhter Thromboseneigung nach extrinsischer Gerinnungsaktivierung höhere systemische FXIa- und Thrombinspiegel als Gesunde aufweisen.

Um solche Unterschiede feststellen zu können, wurde die Kohorte in zwei Untergruppen unterteilt. Eine Untergruppe bestand aus Patienten mit einer VTE in der Vorgeschichte (VTE+). In der anderen Untergruppe mit gesunden Probanden waren keine VTE aufgetreten (VTE-). Sowohl unter den „VTE+“- als auch unter den „VTE-“-Probanden befanden sich Träger der hereditären thrombophilen Risikofaktoren FVL und der Prothrombinmutation 20210G>A. Einschlusskriterium für die „VTE+“-Probanden war, dass die VTE vor mindestens sechs Monaten ohne situative Risikofaktoren (OP, Trauma, Immobilisierung, Schwangerschaft und Wochenbett) aufgetreten war. Ausschlusskriterien für alle Probanden waren eine medikamentöse Therapie mit Antikoagulanzen oder Thrombozytenaggregationshemmern innerhalb von zwei Wochen vor der Blutentnahme,

arterielle kardiovaskuläre oder maligne Vorerkrankungen, akute oder chronische Infektionen, Schwangerschaft oder Stillzeit, pathologische Leber- und Nierenfunktionsparameter sowie ein Mangel an AT, PC oder PS. Der Body-Mass-Index (BMI) aller Studienteilnehmer musste zwischen 18 und 27 kg/m² liegen.

Den nüchternen Probanden wurde ein Bolus von 15 µg/kg rFVIIa intravenös injiziert. Unmittelbar vor und 10 Minuten, 30 Minuten, 1, 2, 3, 5 und 8 Stunden nach der Verabreichung von rFVIIa wurden Blutproben mittels jeweils neuer Venenpunktion einer antekubitalen Vene unter Verwendung von 21G-Flügelinfusionssets entnommen.

Unter Beachtung der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) erfolgte vor Beginn der Studie eine ärztliche Aufklärung der Probanden über Risiken und Nebenwirkungen, die durch die Teilnahme an der Studie entstehen könnten. Die Einwilligung der Probanden wurde schriftlich dokumentiert.

Das Vorhaben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn befürwortet (# 016/16).

2.7.4.2 Probandenrekrutierung und Probengewinnung in der OP-Kohorte

Wie bereits in der 2018 publizierten Studie beschrieben, umfasste die Kohorte 35 Patienten, bei denen unterschiedliche elektive orthopädische OPs durchgeführt wurden (Friedrich et al., 2018). Ausschlusskriterien waren eine angeborene oder erworbene Gerinnungsstörung, sowie eine VTE in der Vorgeschichte.

Die Blutproben wurden 2 Stunden vor und 24 Stunden nach der OP durch eine jeweils neue Venenpunktion einer antekubitalen Vene unter Verwendung eines 21G-Flügelinfusionssets gewonnen. Zum Inzisionszeitpunkt, zur ungefähren Halbzeit der OP und zum Zeitpunkt der Hautnaht erfolgte die Probengewinnung über eine 21G-Venenverweilkanüle in einer Unterarmvene, welche während der gesamten OP mittels einer kontinuierlichen Infusion einer physiologischen Natriumchloridlösung gespült wurde. Zur Vorbeugung von postoperativen thromboembolischen Ereignissen erhielten alle Patienten ab 4 bis 8 Stunden postoperativ einmal täglich 40 mg Enoxaparin subkutan.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden von der Verfasserin die FXIa-Konzentrationen mittels FXIa-ECA in den Blutproben gemessen, die im Rahmen der Studie von Friedrich et al. (2018) gesammelt worden waren. Die Ergebnisse dieser FXIa-Messungen sind in Friedrich et al. (2018) nicht veröffentlicht. Außer FXIa sind alle anderen

in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Messergebnisse der OP-Kohorte bereits zuvor in Friedrich et al. (2018) ohne Mitarbeit der Verfasserin publiziert worden.

2.7.4.3 Präanalytik und Probenlagerung

In beiden Studienformaten enthielten die Blutentnahmeröhrchen Citrat in einer Endkonzentration von 10,5 mmol/l. Zudem enthielten einige der Citratröhrchen entweder Argatroban in einer Endkonzentration von 100 µmol/l zur späteren Bestimmung von Thrombin mittels Thrombin-OECA oder Benzamidin in einer Endkonzentration von 50 mmol/l zur späteren Bestimmung von FXIa mittels FXIa-ECA. Nach der Blutentnahme wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur gelagert und binnen vier Stunden für 10 Minuten bei 2600 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Plasmaproben bis zur Messung bei -40 °C gelagert.

2.7.5 Weitere Laboranalytik

Im Rahmen dieser Arbeit entwickelte oder spezifisch modifizierte Methoden, wie die Messung der FXIa-Konzentration in Plasma mittels FXIa-ECA oder die rFVIIa-induzierte Thrombingenerierung mittels CAT, wurden bereits zuvor beschrieben. Im Folgenden werden nicht neu- oder weiterentwickelte Methoden erläutert. Hierbei handelt es sich um kommerziell erhältliche Tests, die entsprechend den Herstellervorgaben eingesetzt wurden, sowie um den in der Arbeitsgruppe der Verfasserin entwickelten und in mehreren Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eingesetzten Thrombin-OECA. Diese Methoden wurden vor allem zur Untersuchung der im Rahmen der SHAPE- und der OP-Studie gewonnenen Proben eingesetzt.

2.7.5.1 Automatisierte Bestimmungen mit dem Gerinnungsanalyser „BCS®-XP“

Das BCS®-XP-System ist ein vollautomatisiertes Analysegerät, welches komplexe Testschemata zeitgleich durchführt und standardisierte Messergebnisse liefert. Es bietet die Möglichkeit zur parallelen Bearbeitung von koagulometrischen, chromogenen, immunochemischen und agglutinationsbasierten Gerinnungstests. Die Messung erfolgt photometrisch. Die Auswertung der Reaktionskinetiken liefert je nach Messverfahren Testergebnisse in Sekunden oder als Extinktionsänderung pro Minute (Ueckermann, 2008).

2.7.5.1.1 Gerinnungszeiten

Als sogenannte Gruppentests werden üblicherweise die aPTT zur Untersuchung des intrinsischen Systems und zur Überwachung einer Heparintherapie sowie die TPZ zur Untersuchung des extrinsischen Systems und zur Überwachung einer Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten koagulometrisch bestimmt.

Zur aPTT-Messung wird das in Citratröhrchen dekalzifizierte Plasma mit Actin® FS inkubiert, sodass eine Aktivierung der Kontaktfaktoren durch die in Actin® FS enthaltenen Phospholipide und den Oberflächenaktivator Ellagsäure ausgelöst wird. Nach Rekalzifizierung durch die Zugabe von Calciumchlorid wird die Zeit bis zur Gerinnelbildung photometrisch gemessen. Der Referenzbereich liegt zwischen 25 und 33 Sekunden (Siemens, 2013).

Zur Messung der TPZ wird dekalzifiziertes Plasma mit Innovin® inkubiert. Der in Innovin® enthaltene rTF, die Phospholipide und das Calciumchlorid führen zu einer extrinsischen Gerinnungsaktivierung. Die Zeit bis zur Gerinnelbildung wird photometrisch gemessen. Die Umrechnung in den Quick-Wert erfolgt anhand einer Kalibrationskurve. Der Referenzbereich liegt zwischen 70 und 130 % (Siemens, 2013).

2.7.5.1.2 Bestimmung von Gerinnungsfaktoren

Die Einzelfaktorbestimmung erfolgt standardmäßig koagulometrisch entweder über die aPTT- oder die TPZ-Messung im BCS®-XP-System, indem das Citratplasma mit dem entsprechenden Faktor-Mangelplasma verdünnt wird. Die im Plasma enthaltene Faktormenge wird dadurch für die Zeit zur Gerinnelbildung zur limitierenden Größe. Anhand des Vergleichs der gemessenen Gerinnungszeit mit einer Standardkurve, die mit seriell verdünntem Normalplasma erstellt wurde, kann eine Prozentangabe der Gerinnungsaktivität des untersuchten Einzelfaktors bezogen auf die Norm angegeben werden. Zur Einzelfaktorbestimmung über die TPZ-Messung stehen Mangelplasmen für FII, FV, FVII und FX zur Verfügung. Die Einzelfaktorbestimmung mittels aPTT-Messung verwendet Mangelplasmen für FVIII, FIX, FXI und FXII. Die Referenzbereiche liegen überwiegend zwischen 70 und 120 % der Norm, lediglich bei FVIII und FXII zwischen 70 und 150 % (Siemens, 2013).

2.7.5.1.3 Bestimmung von Gerinnungsinhibitoren

Die AT-Bestimmung beruht auf einem chromogenen Messprinzip. Citratplasma wird je nach Methode mit einem Überschuss an Thrombin oder FXa versetzt. In Anwesenheit von Heparin wird ein Teil des Thrombins / FXa durch das in der Probe vorhandene AT gebunden und inaktiviert. Das überschüssige ungehemmte Thrombin / FXa spaltet anschließend ein spezifisches chromogenes Substrat unter Farbstofffreisetzung. Die Geschwindigkeit der Substratspaltung wird photometrisch bestimmt. Je größer die Extinktionszunahme, desto niedriger ist die AT-Aktivität in der Probe. Die Referenzwerte liegen je nach Methode ungefähr zwischen 80 und 120 % der Norm (Siemens, 2013).

Die PC-Bestimmung erfolgt entweder chromogen oder koagulometrisch. Bei dem chromogenen Messprinzip wird PC der Plasmaprobe mit dem Gift der Schlange *Agkistrodon contortrix* als Aktivator aktiviert und spaltet anschließend ein chromogenes Substrat. Die Extinktionszunahme ist direkt proportional zur PC-Aktivität. Bei dem koagulometrischen Messprinzip hemmt durch den Schlangengift-Aktivator aktiviertes PC FV und FVIII eines zugesetzten PC-Mangelplasmas. Die Hemmung verlängert die anschließend gemessene aPTT. Die aPTT-Verlängerung ist dabei ein Maß für den PC-Spiegel in der Probe. Der Referenzbereich liegt zwischen 70 und 140 % der Norm (Siemens, 2013).

Die Plasmakonzentration des freien PS-Antigens wird mithilfe eines Antigentests ermittelt. Dabei aggregiert freies PS mit Polystyrolpartikeln, die mit zwei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Das Ausmaß der Aggregation ist dabei proportional zur Konzentration des freien PS und wird anhand der Trübungszunahme turbidimetrisch gemessen. Der Referenzbereich liegt zwischen 60 und 114 % der Norm bei Frauen und zwischen 68 und 139 % der Norm bei Männern (Siemens, 2013).

2.7.5.1.4 D-Dimer-Bestimmung

D-Dimere sind Aktivierungsmarker, welche eine stattgehabte Fibrinbildung durch eine Gerinnungsaktivierung und deren nachfolgende Fibrinolyse belegen. Sie werden im BCS[®]-System mithilfe eines Antigentests gemessen. Die D-Dimere einer Plasmaprobe aggregieren mit zugesetzten Polystyrolpartikeln, die mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet sind. Die Aggregationsreaktion führt zu einer Trübungszunahme, welche

turbidimetrisch gemessen wird. Hierdurch ermittelte Konzentrationen über dem Grenzwert von 0,5 mg/l zeigen eine gesteigerte Gerinnung an (Siemens, 2013).

2.7.5.2 Bestimmung von indirekten Markern der Thrombinbildung mittels ELISA

F1+2, welches während der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin abgespalten wird, zirkuliert mit einer Halbwertszeit von knapp zwei Stunden in der Blutbahn (Rühl et al., 2015). Die F1+2-Bestimmung erfolgte mit Hilfe des direkten Sandwich-ELISA unter Verwendung des Enzygnost F1+2 (monoclonal) Kits von Siemens Heathcare Diagnostic Products. Hierbei wird nach Gabe der Plasmaproben in die Wells einer Mikrotiterplatte zunächst F1+2 an einen spezifischen Capture-Antikörper gebunden. Anschließend bindet das fixierte F1+2 einen Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper. Die Peroxidase aktiviert das zugegebene Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), sodass eine Blaufärbung eintritt. Nach Zugabe einer Schwefelsäure-haltigen Stopplösung färbt sich TMB gelb. Die Extinktion wird photometrisch gemessen. Die Farbintensität ist proportional zur F1+2-Konzentration, welche anhand eines Vergleiches mit einer Kalibrationskurve bestimmt wird. Der Referenzbereich liegt zwischen 69 und 229 pmol/l (Siemens, 2013). TAT zirkuliert mit einer Halbwertszeit von 44 Minuten in der Blutbahn (Rühl et al., 2015). Die TAT-Messung erfolgte mit Hilfe des direkten Sandwich-ELISA unter Verwendung des Enzygnost TAT (micro) Kits von Siemens Heathcare Diagnostic Products. Der TAT-Komplex wird zunächst durch einen thrombinspezifischen Capture-Antikörper fixiert. Anschließend bindet ein Peroxidase-konjugierter Detektionsantikörper an das AT. Die Extinktion wird photometrisch durch die Gelbfärbung des Substrates TMB gemessen, sodass eine Bestimmung der TAT-Konzentration möglich ist. Der Referenzbereich liegt zwischen 2,0 und 4,2 µg/l (Siemens, 2013).

2.7.5.3 OECA zur Bestimmung von in vivo generiertem Thrombin

Zur Probenentnahme wurden Citratröhrchen verwendet, die mit 100 µmol/l Argatroban versetzt waren, welches ein reversibler Inhibitor des aktiven Zentrums von Thrombin ist. Hierdurch wird unmittelbar eine irreversible Hemmung von Thrombin durch endogene Thrombininhibitoren verhindert. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit Streptavidin beschichtet, um eine spätere Fixierung des Aptamers an der Plattenoberfläche zu ermöglichen. Hierzu wurden die Wells mit 100 µl einer Lösung mit 10 µg/ml BSA-Biotin in

Beschichtungspuffer befüllt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem automatisierten dreimaligen Waschvorgang wurden 100 µl einer Lösung mit 10 µg/ml Streptavidin in Waschpuffer mit 1 mg/ml BSA in die Wells pipettiert. Während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur bindet Streptavidin einerseits an das BSA-Biotin, andererseits verbleibt eine offene Bindungsstelle für die als Fänger dienenden Aptamere. Anschließend wurden die Wells nach einem erneuten Waschvorgang mit je 200 µl des Blockpuffers über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um eine spätere unspezifische Bindung von anderen Probeninhaltsstoffen an die Plattenoberfläche zu verhindern. Nach Entfernen der Pufferreste wurden die Platten bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert (Müller et al., 2011).

Zur Testdurchführung wurden die so mit Streptavidin-Biotin benetzten Wells mit dem 3'-biotinylierten Anti-Thrombin-Aptamer HD1-22 beschichtet, das in einer Konzentration von 10 nmol/l (1 pmol/Well) in Aptamerpuffer eingesetzt wurde. Das bivalente Aptamer HD1-22 bindet hochselektiv gleichzeitig an beide allosterischen Bindungsstellen des Thrombins, Exosite I und II. Das im Puffer enthaltene Magnesiumchlorid stabilisiert die Struktur des Aptamers. In jedes Well wurden jeweils 100 µl der Aptamerlösung pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Wells mit jeweils 100 µl des Probenplasmas oder der Kalibratoren befüllt. Die Kalibratoren mit halblogarithmischen Konzentrationsintervallen von 0 bis 10 ng/ml (0 bis 272 pmol/l) Thrombin wurden in einer den Proben entsprechenden Matrix hergestellt. Während einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Thrombin-Argatroban-Komplexe der Proben und Kalibratoren durch HD1-22 gebunden. Anschließend wurden die Plasmareste und das reversibel gebundene Argatroban in einem Waschvorgang entfernt. Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden die Wells dabei zunächst mit einer 8-Kanal-Pipette abgesaugt, wobei für jede Spalte neue Spitzen verwendet wurden. Anschließend wurden die Wells mit jeweils 250 µl Waschpuffer befüllt und die gesamte Platte dreimalig automatisch gewaschen (Müller et al., 2011).

Anschließend erfolgte die Zugabe des thrombinspezifischen Peptidsubstrates (Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC, 100 µmol/l in TBS-Substratpuffer). Je 100 µl der Substratlösung wurden in die Wells pipettiert. Durch die proteolytische Spaltung des Substrates durch das funktionell intakte Thrombin wurde der Indikator freigesetzt und konnte fluorometrisch

gemessen werden. Es folgte zunächst unmittelbar anschließend eine Basisfluoreszenzmessung. Nach zwei Stunden erfolgte eine erneute Fluoreszenzmessung, wobei der Betrag der Fluoreszenzemissionszunahme bei Vorliegen eines Substratüberschusses proportional zur in einem Well vorhandenen Menge an funktionell aktivem Thrombin war (Müller et al., 2011). Die von den Kalibratoren erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden durch eine 4-Parameter-Kurvenfunktion interpoliert und als Standardkurve zur Berechnung der Thrombinkonzentrationen in den Proben verwendet. Bei Messung im Dreifachansatz wurde abschließend der Mittelwert der gemessenen Thrombinkonzentrationen ermittelt.

2.7.5.4 STACLOT® VIIa-rTF-Assay zur FVIIa-Messung

Mit dem kommerziellen Gerinnungstest der Firma Stago wurde die FVIIa-Konzentration der Plasmaproben gemessen. Dabei wird das extrinsische System einer Plasmaprobe durch die Zugabe von rTF aktiviert, welcher selbst nicht in der Lage ist FVII zu aktivieren. Der in der Probe vorhandene FVIIa bildet einen Komplex mit dem rTF und führt in Anwesenheit von Phospholipiden und Ca^{2+} zur Gerinnungsbildung. Die Gerinnungszeit wird koagulometrisch gemessen. Anhand des Vergleichs mit den Werten der Kalibratoren, welche aus NPP mit rFVIIa bestehen, kann die FVIIa-Konzentration der Probe berechnet werden (Amiral et al., 2017; Morrissey et al., 1993).

2.7.6 Datenauswertung

In der Datenauswertung werden die Messergebnisse aus beiden Kohorten (SHAPE- und OP-Kohorte) als Medianwerte und Interquartilbereiche (IQR) dargestellt. Um eine Normalverteilung der Daten zu prüfen, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. In Abhängigkeit von der Verteilung der Daten wurde zur Varianzanalyse ein ANOVA- oder ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Um die Daten der Probanden aus der „VTE+“- und „VTE“-Untergruppe der SHAPE-Kohorte miteinander zu vergleichen, wurde anschließend ein ungepaarter Student-T-Test oder ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. In beiden Kohorten (SHAPE- und OP-Kohorte) wurde der Wilcoxon-Signed-Rank-Test verwendet, um Messwerte an unterschiedlichen Probeentnahmezeitpunkten miteinander zu vergleichen. Zur Korrektur des α -Fehlers wurde die Bonferri-Methode angewandt.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung des FXIa-ECA

Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um die geeignete Puffermatrix und die idealen Verdünnungskonzentrationen für eine möglichst sensitive und spezifische FXIa-Bestimmung zu erzielen und so den FXIa-ECA zu optimieren.

3.1.1 Ermittlung der geeigneten Capture-Antikörper-Konzentration im FXIa-ECA

Zu den grundsätzlichen Anforderungen an den FXIa-ECA gehört eine stabile und reproduzierbare Hydrolyserate des fluorogenen Substrates bei verschiedenen FXIa-Konzentrationen. Dazu ist eine bestimmte Konzentration des FXIa-Capture-Antikörpers AHXI-5061 zur Beschichtung der Wells der Mikrotiterplatten notwendig. Um die optimale Antikörperkonzentration zu ermitteln, wurden die Wells mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers in einer geometrischen Verdünnungsreihe zwischen 0 und 10 µg/ml in Beschichtungspuffer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper in einem Waschvorgang entfernt. FXIa wurde in Puffer (PBS, 1 mg/ml BSA, pH 7,4) mit Endkonzentrationen von 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml eingesetzt. Die beschichteten Wells wurden mit jeweils 100 µl der FXIa-Ansätze befüllt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Hydrolyserate des fluorogenen FXIa-Substrates Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC. Es zeigte sich, dass eine Mindestkonzentration von 1 µg/ml AHFXI-5061 für eine stabile Hydrolyserate bei verschiedenen FXIa-Konzentrationen nötig war (Abb. 7).

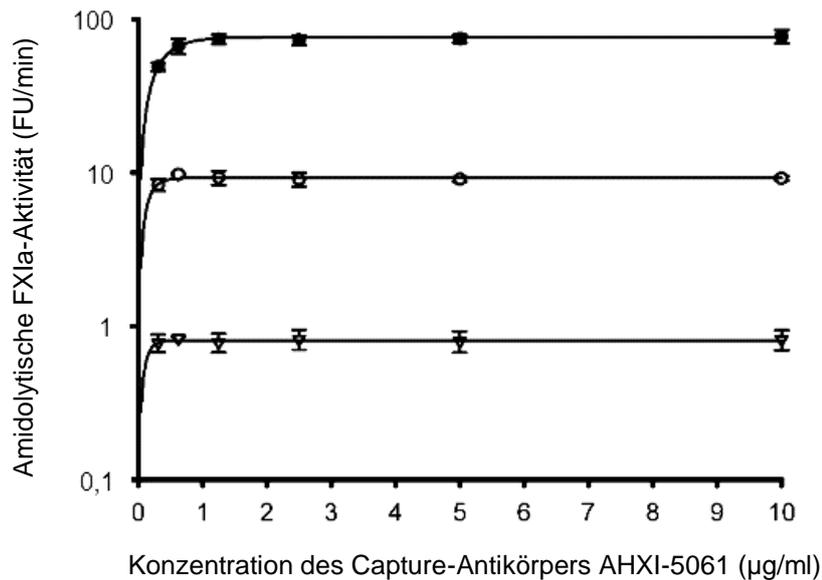


Abb. 7: Ermittlung der optimalen Konzentration des Capture-Antikörpers

Gezeigt ist die amidolytische Aktivität von FXIa bei FXIa-Konzentrationen von 100 ng/ml (●), 10 ng/ml (○) und 1 ng/ml (▽) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen des Capture-Antikörpers AHFI-5061. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten und die Fehlerbalken den Standardabweichungen von drei Bestimmungen (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Wells in allen folgenden Experimenten mit einer Antikörperkonzentration von 4 µg/ml beschichtet.

3.1.2 Ermittlung der geeigneten Benzamidinkonzentration im FXIa-ECA

Um eine präanalytische Inaktivierung von FXIa durch endogene Inhibitoren zu verhindern, bedarf es einer reversiblen Hemmung des aktiven Zentrums von FXIa. Hierzu geeignet ist Benzamidin, ein reversibler kompetitiver Inhibitor von Trypsin, Trypsin-ähnlichen Enzymen und Serinproteasen. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Benzamidinkonzentrationen auf die amidolytische Aktivität von FXIa in Puffer untersucht (Abb. 8, A). Hierzu wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von Benzamidin in Puffer (PBS, 1 mg/ml BSA, pH 7,4) hergestellt. Die einzelnen Benzamidinverdünnungsstufen wurden zu einer mit 2 ng/ml FXIa versetzten Pufferlösung gegeben, sodass Endkonzentrationen von Benzamidin zwischen 0 und 100 mmol/l erreicht wurden. Anschließend wurde die Hydrolyserate des fluorogenen FXIa-Substrates Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC gemessen.

Des Weiteren wurde eine FXIa-Messung mittels ECA durchgeführt, wobei der Puffer mit verschiedenen Benzamidinkonzentrationen versetzt war und eine FXIa-Endkonzentration von 2 ng/ml enthielt (Abb. 8, B). Die Wells einer mit 4 µg/ml des FXIa-Antikörpers AHXI-5061 beschichteten Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 100 µl der Lösung befüllt und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Hydrolyserate des FXIa-Substrates durch den an die Capture-Antikörper gebundenen FXIa.

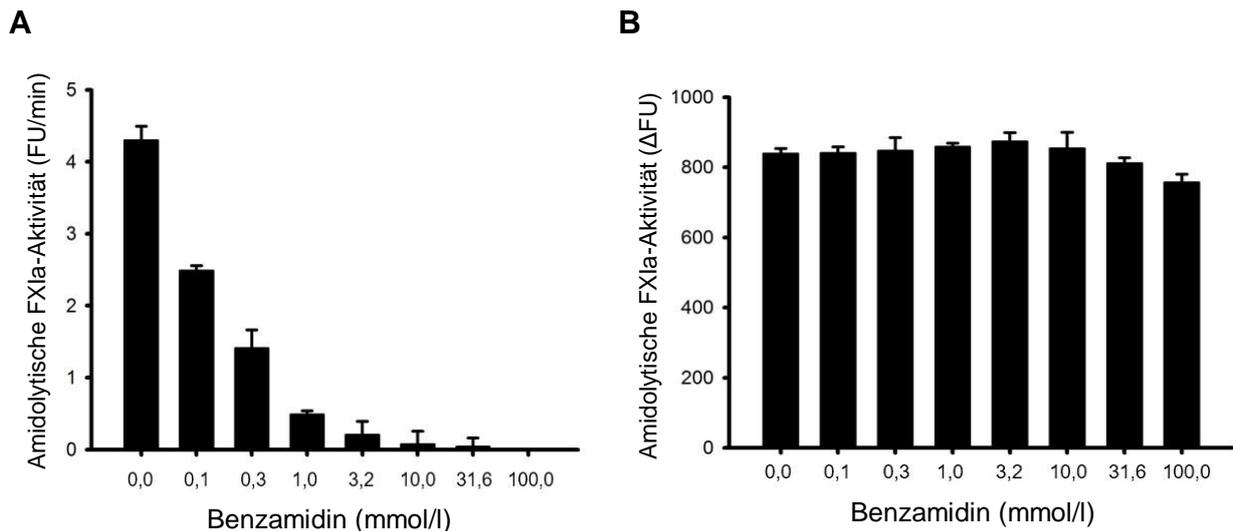


Abb. 8: Einfluss verschiedener Benzamidinkonzentrationen auf die amidolytische Aktivität von FXIa

(A) Die amidolytische Aktivität von FXIa wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Benzamidinkonzentrationen in Puffer (PBS, 1 mg/ml BSA, pH 7,4) durch die Bestimmung der Hydrolyserate eines fluorogenen Substrates ohne den Einsatz eines Antikörper-basierten Messverfahrens bestimmt. (B) Die amidolytische Aktivität von FXIa wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Benzamidinkonzentrationen in Puffer unter Verwendung des ECA-Messverfahrens bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt (n = 3 Messungen) (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Es zeigte sich, dass eine Benzamidinkonzentration von 100 mmol/l ausreichend war, um ohne signifikante Beeinträchtigung der FXIa-Messung mittels ECA das aktive Zentrum von FXIa temporär zu blockieren. In allen folgenden Experimenten wurde eine Benzamidinendkonzentration von 100 mmol/l verwendet.

3.1.3 Einfluss des Zymogens FXI auf die FXIa-Messung

Um den Einfluss des Zymogens FXI auf die FXIa-Messergebnisse zu beurteilen, wurden Plasmaproben mit endogenen FXI-Aktivitätsspiegeln zwischen 64 % und 111 % mit exogenem FXIa (Endkonzentration 4 ng/ml) versetzt und in Benzamidin-haltigem Probenverdünnungspuffer 1:4 und 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Durchführung des ECA zur Messung der amidolytischen Aktivität von FXIa (Abb. 9).

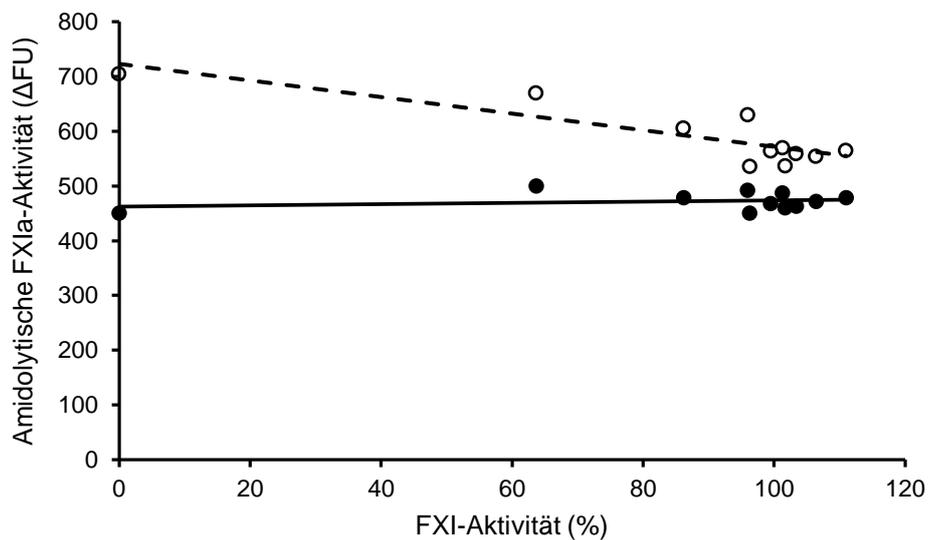


Abb. 9: Einfluss des Zymogens FXI auf die FXIa-Messung mittels ECA

Dargestellt ist die gemessene amidolytische FXIa-Aktivität nach exogener Zugabe von 4 ng/ml FXIa zu unterschiedlich verdünnten Plasmaproben mit endogenen FXI-Aktivitätsspiegeln zwischen 64 % und 111 %. Dabei wurden die Proben 1:4 (O) und 1:10 (●) in Puffer (PBS, 1 mg/ml BSA, 100 mmol/l Benzamidin, 25 mmol/l Natriumcitrat, pH 7,4) verdünnt (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Die mittels ECA gemessene amidolytische Aktivität des exogen zu den Proben zugesetzten FXIa wurde in der 1:10-Verdünnung nicht durch die Anwesenheit des Zymogens FXI beeinflusst.

3.1.4 Ermittlung der geeigneten Probenverdünnung

In einem weiteren Experiment wurden die FXIa-Messergebnisse einer geometrischen Verdünnungsreihe von exogenem FXIa in Puffer, in FXI-Mangelplasma und in NPP miteinander verglichen. Nach Zugabe der verschiedenen FXIa-Verdünnungsstufen wurden die Proben weiter 1:4 und 1:10 in Benzamidin-haltigem Probenverdünnungspuffer

verdünnt. Anschließend wurde die amidolytische Aktivität des exogen zugegebenen FXIa mittels ECA gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass FXIa in jeder Verdünnungsstufe sowohl in einer Probenverdünnung von 1:4 (Abb. 10, A) als auch von 1:10 (Abb. 10, B) messbar war. Allerdings zeigten lediglich die Ergebnisse der 1:10-Probenverdünnung eine Übereinstimmung in den drei verschiedenen Probenmatrizen.

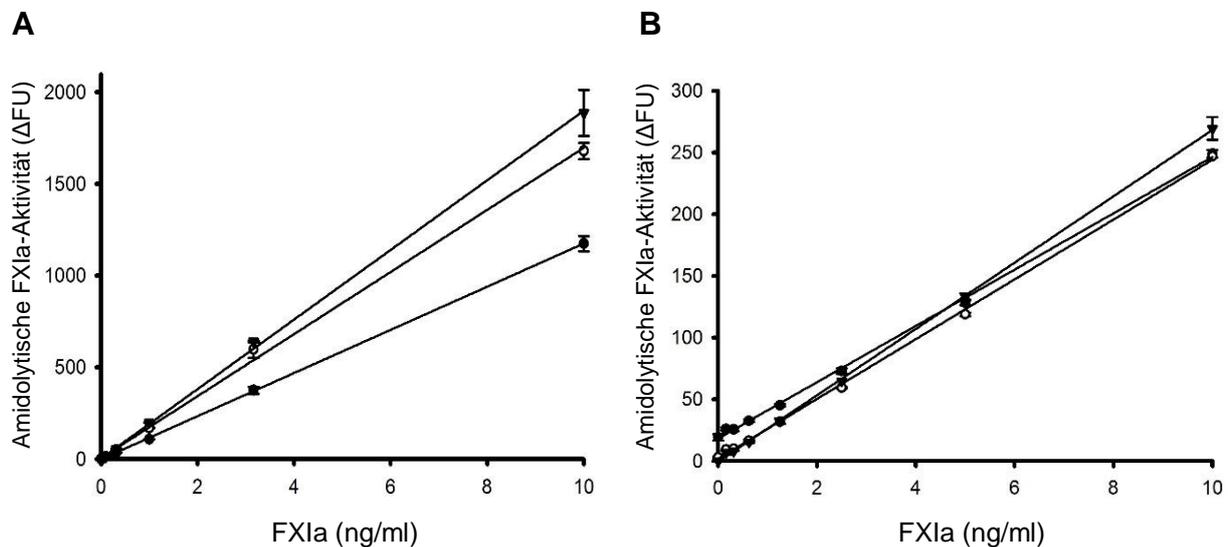


Abb. 10: Messergebnisse im FXIa-ECA in Abhängigkeit von der Verdünnung
 FXIa wurde in den angegebenen Konzentrationen in Puffer (▼), FXI-Mangelplasma (○) und normalem Poolplasma (●) eingesetzt. (A) zeigt die FXIa-Messergebnisse nach einer 1:4-Verdünnung und (B) nach einer 1:10-Verdünnung in Puffer (PBS, 1 mg/ml BSA, 100 mmol/l Benzamidin, 25 mmol/l Natriumcitrat, pH 7,4). Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten und die Fehlerbalken Standardabweichungen von jeweils drei Bestimmungen (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Plasmaproben in allen folgenden Experimenten mit dem Faktor 1:10 in Puffer verdünnt.

3.1.5 Untersuchung der präanalytischen Stabilität von FXIa in Abhängigkeit von Verdünnung, Lagerungszeit und Lagerungstemperatur

Die Messung der FXIa-Generierungskinetik *in vitro* erfordert eine verlässliche präanalytische Stabilität über einen gewissen Zeitraum. Um die FXIa-Stabilisierungskapazität von Benzamidin in den Blutproben über einen bestimmten Zeitraum bei verschiedenen Lagerungstemperaturen zu analysieren, wurde sowohl in Citratröhrchen entnommenes Vollblut als auch Citratplasma mit exogenem FXIa versetzt,

sodass eine FXIa-Endkonzentration von 10 ng/ml erreicht wurde. Anschließend wurden die FXIa-haltigen Vollblut- und Plasmaproben aufgeteilt und entweder bei Raumtemperatur oder bei 4 °C gelagert. Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurden den Proben Aliquots entnommen, die Vollblutproben zentrifugiert und das jeweilige Plasma bei -40 °C bis zur Durchführung des ECA gelagert.

Des Weiteren wurde die FXIa-Stabilität abhängig von dem Verdünnungsfaktor der Plasmaproben über einen bestimmten Zeitraum analysiert. Hierzu wurden die Plasmaproben unmittelbar nach der FXIa-Zugabe 1:10 in Benzamidin-haltigem Probenverdünnungspuffer verdünnt und anschließend über einen Zeitraum von 48 Stunden bei einer Lagerung bei Raumtemperatur Aliquots entnommen und eingefroren. Alternativ wurden die Plasmaproben nach FXIa-Zugabe unverdünnt bei Raumtemperatur gelagert, nach bestimmten Zeitintervallen 1:10 verdünnt und bis zur Durchführung des ECA bei -40 °C gelagert. Die Auswertung ergab, dass in mit Benzamidin und Citrat versetztem Vollblut über 95 % der FXIa-Konzentration während einer 30-minütigen Lagerung bei 4 °C erhalten blieb. Die Lagerung bei Raumtemperatur verringerte die nach 30 Minuten gemessene FXIa-Konzentration auf 80 % des Ausgangswertes. Im Plasma hingegen konnten über 95 % der FXIa-Konzentration während einer Lagerungszeit von 12 Stunden bei 4 °C und von 1 Stunde bei Raumtemperatur erhalten werden (Abb. 11, A). Wenn die Plasmaproben nach der FXIa-Zugabe sofort 1:10 in Probenverdünnungspuffer verdünnt wurden, konnte auch nach einer Lagerungszeit von 48 Stunden bei Raumtemperatur kein Verlust der FXIa-Konzentration festgestellt werden (Abb. 11, B). Anhand dieser Ergebnisse ist sichergestellt, dass die FXIa-Konzentration in den Proben während der Generierungsversuche und während der Inkubationszeiten des FXIa-ECA erhalten bleibt.

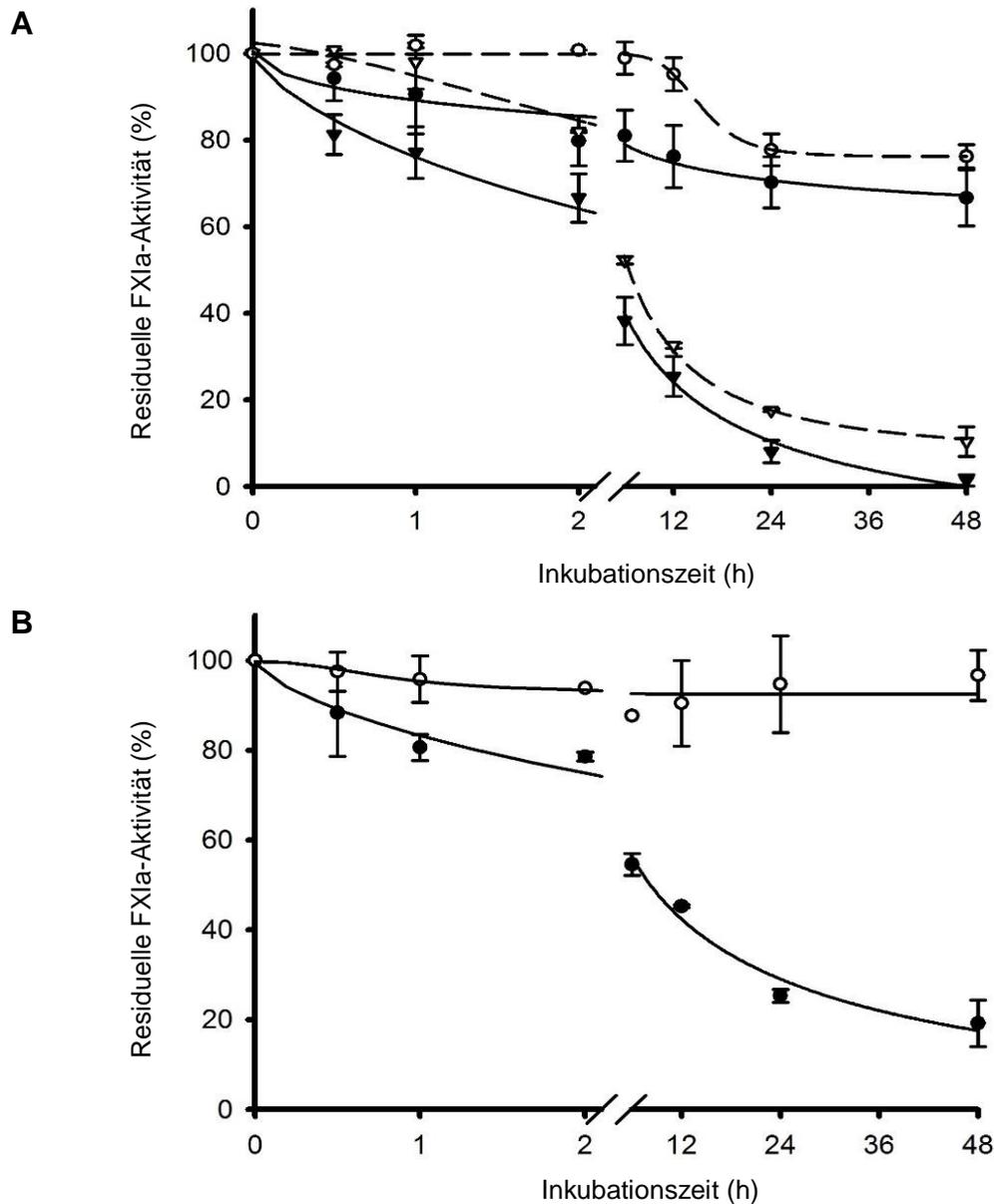


Abb. 11: Einfluss der Lagerungsbedingungen und der Verdünnung auf die FXIa-Stabilität (**A**) FXIa wurde zu mit Benzamidin versetztem Citrat-Vollblut (▼ Lagerung bei Raumtemperatur, ● Lagerung bei 4 °C) oder zu mit Benzamidin versetztem Citratplasma (▽ Lagerung bei Raumtemperatur, ○ Lagerung bei 4 °C) hinzugegeben (Endkonzentration 10 ng/ml). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und FXIa mittels ECA gemessen. Die Messergebnisse sind in Relation zur vor Lagerung (t = 0) gemessenen FXIa-Konzentration (= 100 %) als Mittelwert und Standardabweichung (n = 3 Experimente) dargestellt. (**B**) FXIa wurde zu mit Benzamidin versetztem Citratplasma gegeben. Entweder wurden die Proben unverdünnt bei Raumtemperatur gelagert und zu den angegebenen Zeitpunkten 1:10 verdünnt (in PBS, 1 mg/ml BSA, 100 mmol/l Benzamidin, 25 mmol/l Natriumcitrat, pH 7,4) und bei -40 °C eingefroren (●), oder die Proben wurden direkt 1:10 verdünnt, bei Raumtemperatur gelagert und zu den angegebenen Zeitpunkten bei -40 °C eingefroren (○) (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

3.1.6 Einsatz eines Kofaktors für die thrombininduzierte FXI-Aktivierung in vitro

Um FXI ausschließlich durch Thrombin zu aktivieren, wird in vitro ein anionischer Kofaktor benötigt. In einer ersten Reihe von Experimenten wurde der Einsatz von Dextransulfat, Heparansulfat und Polyphosphat als Kofaktor getestet. Thrombin und FXI wurden in einer jeweiligen Endkonzentration von 100 ng/ml zusammen mit den verschiedenen Kofaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen in PBS mit 1 mg/ml BSA bei 37 °C inkubiert. Nach 10 Minuten wurde Benzamidin zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 100 mmol/l erreicht wurde. FXIa wurde anschließend mittels ECA quantifiziert.

Es wurden jeweils verschiedene Konzentrationen einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe der Kofaktorkandidaten getestet. Bei Dextransulfat lagen sie zwischen 1 ng/ml und 100 µg/ml, bei Heparansulfat zwischen 1 µg/ml und 100 µg/ml, bei Polyphosphat p45 zwischen 10 µg/ml und 1 mg/ml und bei Polyphosphat p30 und p70 zwischen 1 ng/ml und 1 µg/ml. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurden keine höheren Konzentrationen von p30 und p70 eingesetzt. Die Auswertung der Versuchsansätze zeigte, dass die höchste Konzentration an generiertem FXIa erreicht wurde, wenn FXI, Thrombin und Dextransulfat in gleichen Konzentrationen von 100 ng/ml im Reaktionsgemisch eingesetzt wurden (Abb. 12).

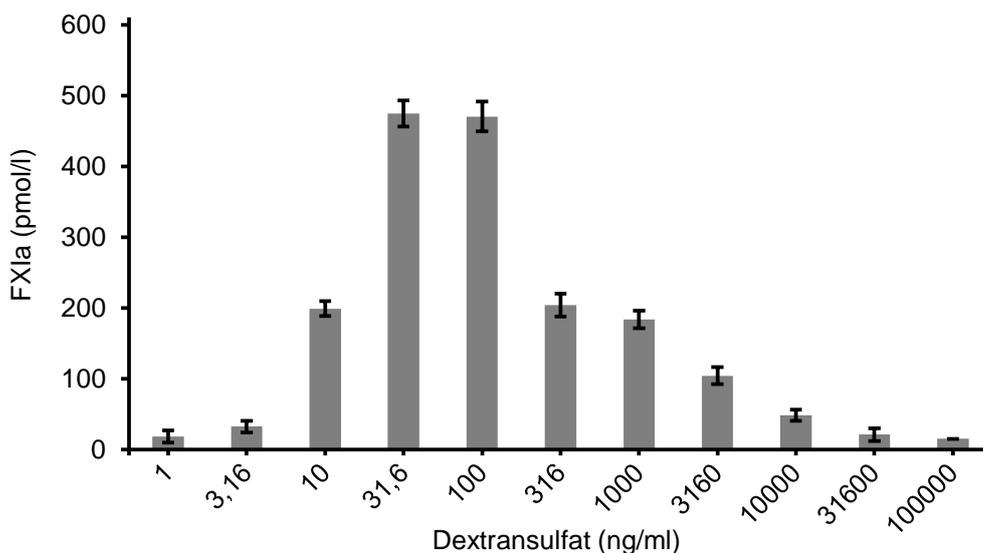


Abb. 12: Thrombininduzierte FXI-Aktivierung in Abhängigkeit von der Dextransulfatkonzentration

Dargestellt sind die mittels ECA gemessenen FXIa-Konzentrationen bei den angegebenen Konzentrationen des Kofaktors Dextransulfat in Puffer (BPS mit 1 mg/ml BSA) mit jeweils 100 ng/ml Thrombin und FXI. Säulen zeigen die Mittelwerte und Fehlerbalken die Standardabweichungen von n = 3 Messungen (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Die Versuche mit den anderen Kofaktorkandidaten wiederum führten zu keiner im ECA nachweisbaren FXIa-Generierung.

3.1.7 Western Blot

Um zu verifizieren, dass die mittels ECA ermittelten Ergebnisse tatsächlich eine Aktivierung von FXI durch Thrombin in Gegenwart von Dextransulfat repräsentierten, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abb. 13).

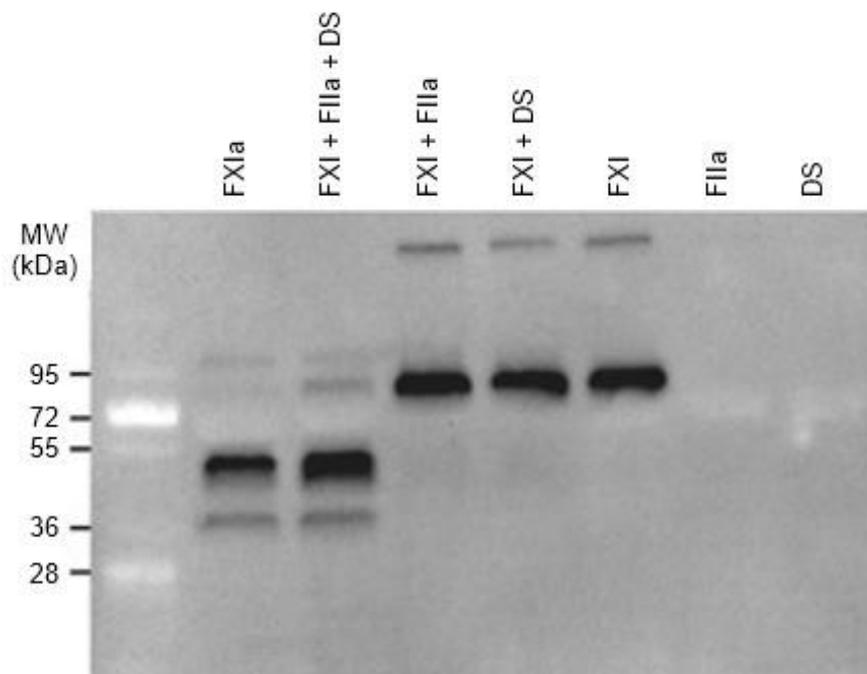


Abb. 13: Western-Blot-Analyse verschiedener Reaktionsansätze mit FXI, Thrombin und Dextransulfat

Die Reaktionsansätze enthielten eine jeweilige Endkonzentration von 40 µg/ml FXI, Thrombin (FIIa) und Dextransulfat (DS). Links abgebildet ist ein Proteingrößenmarker (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Lediglich der Ansatz mit FXI, Thrombin und Dextransulfat zeigte eine Generierung von FXIa. Weder Thrombin noch Dextransulfat allein waren in der Lage, FXI zu aktivieren.

3.1.8 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Reproduzierbarkeit des FXIa-ECA

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und der unteren Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ) von FXIa im FXIa-ECA erfolgte eine sechsfache Messung einer Verdünnungsreihe von exogen zugegebenem FXIa in NPP. Als LOD wurde das Dreifache und als LLOQ das Neunfache der Standardabweichung der ersten messbaren FXIa-Konzentration oberhalb des Leerwertes festgelegt. Die LOD entsprach einer FXIa-Konzentration von 0,931 pmol/l und die LLOQ von 3,481 pmol/l.

Die Reproduzierbarkeit des FXIa-ECA wurde untersucht, indem Plasmaproben mit FXIa-Konzentrationen zwischen 1 und 10 pmol/l separat jeweils dreifach an drei verschiedenen Tagen mittels FXIa-ECA gemessen wurden. Der maximale Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK) betrug 17,1 % bei den an verschiedenen Tagen gemessenen Ansätzen mit der niedrigsten FXIa-Konzentration. In allen übrigen Ansätzen lagen die Intra- und Inter-Assay-VK unter diesem Wert (Tab. 1).

Tab. 1: Reproduzierbarkeit des FXIa-ECA

Aufgelistet sind die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) bei der Messung von drei Ansätzen mit verschiedenen, exogen zugegebenen FXIa-Plasmakonzentrationen mittels FXIa-ECA. Neben dem Mittelwert ist für den Intra-Assay-VK zusätzlich die Standardabweichung angegeben (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Zur Plasmaprobe zugegebene FXIa-Konzentration, pmol/l	Intra-Assay-VK, %	Inter-Assay-VK, %
10	5,6 ± 2,3	8,5
2,5	12,2 ± 8,6	13,8
1	11,0 ± 6,7	17,1

3.2 FXI-Aktivierung in vitro

Abhängig von der FXI-Aktivierungsmethode und dem FXI-Aktivitätsspiegel der Plasmaprobe zeigten sich deutliche Unterschiede in der Aktivierungsdynamik von FXI.

3.2.1 Aktivierung von FXI durch die Kontaktphase

Zunächst wurde die Aktivierungsdynamik von FXI in NPP durch die Zugabe des aPTT-Reagenzes Actin® FS untersucht. In einem Kontrollexperiment mit FXII-Mangelplasma wurde kein FXIa nach Zugabe des aPTT-Reagenzes nachgewiesen. Eine repräsentative FXIa-Generierungskurve nach Kontaktaktivierung ist in Abb. 14 dargestellt. Nach ungefähr 3 Minuten wurde eine Spitzenkonzentration von $17,09 \pm 2,67$ nmol/l erreicht.

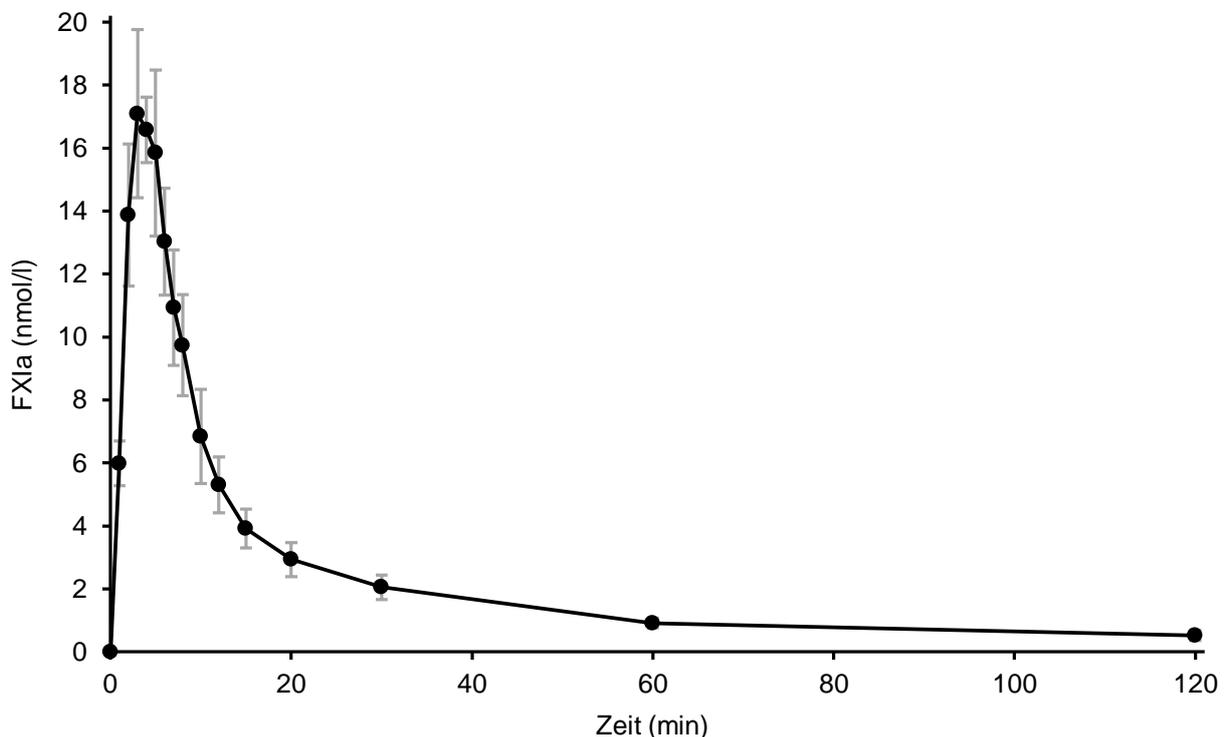


Abb. 14: Repräsentative FXIa-Generierungskurve nach Kontaktaktivierung in normalem Poolplasma (NPP)

Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels ECA gemessenen FXIa-Konzentrationen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe des aPTT-Reagenzes Actin® FS zu NPP im Verhältnis 1:5. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken abgebildet (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

3.2.2 Aktivierung von FXI durch Thrombin plus Kofaktor

In normalem menschlichem Plasma liegt eine FXI-Konzentration von ca. 5 µg/ml vor. Den Ergebnissen im Puffersystem aus Kapitel 3.1.6 entsprechend, führte im Citratplasma eine Konzentration von 5 µg/ml (= 136 nmol/l) Thrombin und 5 µg/ml Dextransulfat nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37 °C und anschließender Benzamidinzugabe (100 mmol/l) zu einer maximalen FXIa-Generierung von ca. 384,4 ± 29,4 pmol/l.

Um in diesem Versuchsansatz eine Aktivierung von FXI durch die Kontaktphase auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit defibriertem NPP, das den Kontaktphaseninhibitor CTI in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder den Thrombininhibitor Argatroban in einer Endkonzentration von 190 µmol/l enthielt, durchgeführt. Während die Hemmung der Kontaktphase keinen signifikanten Einfluss auf die FXIa-Generierung über einen Zeitraum von 20 Minuten mit einer maximalen FXIa-Konzentration von ca. 359,4 ± 30,9 pmol/l nach 10 Minuten hatte, blieb die FXIa-Generierung in der Anwesenheit von Argatroban vollständig aus (Abb. 15).

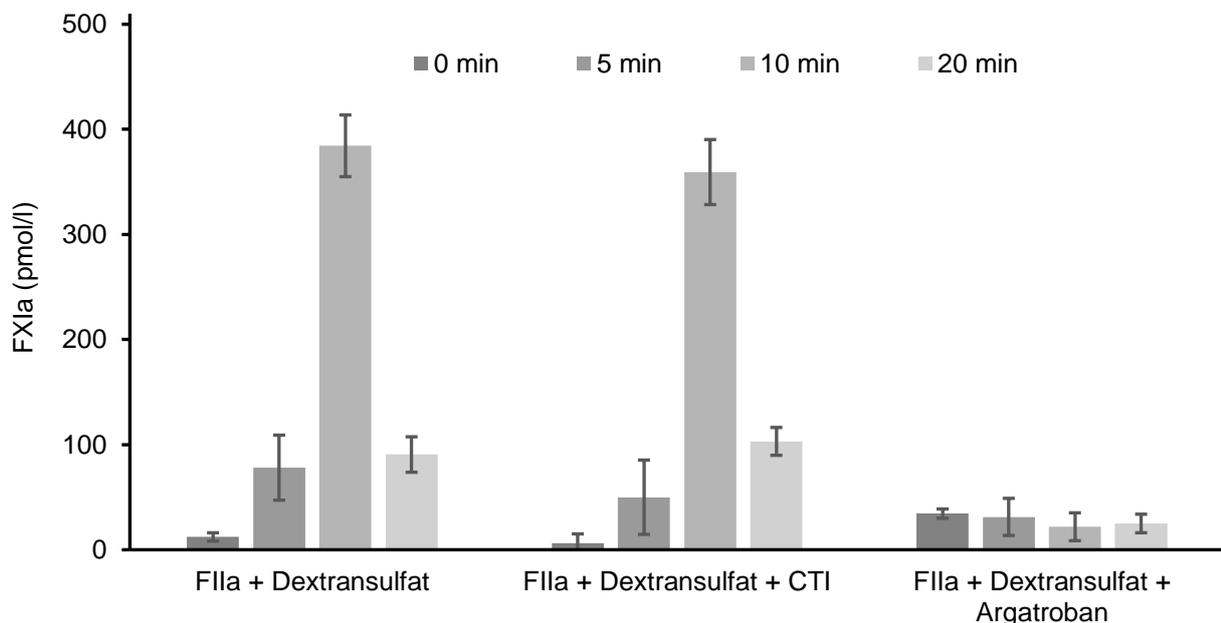


Abb. 15: Kontrollexperimente zum Ausschluss einer Beteiligung des Kontaktsystems während der FXI-Aktivierung durch Thrombin und den Kofaktor Dextransulfat. Dargestellt sind die mittels ECA gemessenen FXIa-Konzentrationen zu den angegebenen Zeitpunkten nach FXI-Aktivierung durch Thrombin (5 µg/ml = 136 nmol/l, FIIa) und Dextransulfat (5 µg/ml) in defibriertem Poolplasma. Durch Corn-Trypsin-Inhibitor (100 µg/ml, CTI) wurde das Kontaktsystem inhibiert. Durch Argatroban (190 µmol/l) wurde Thrombin inhibiert. Mittelwerte sind als Säulen und Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die folgenden thrombinabhängigen In-vitro-FXIa-Generierungsexperimente in Anwesenheit von Dextransulfat, wenn nicht anders angegeben, in einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 durchgeführt.

Eine typische thrombinabhängige Generierungskurve von FXIa in NPP ist in Abb. 16 dargestellt. Neben der FXIa-Generierungskurve nach Aktivierung mit 5 µg/ml (136 nmol/l) Thrombin und 5 µg/ml Dextransulfat ist zusätzlich die FXIa-Generierungskurve nach Aktivierung mit einer niedrigeren Thrombinkonzentration von 0,5 µg/ml (13,6 nmol/l) und 5 µg/ml Dextransulfat abgebildet. Nach ungefähr 8 Minuten wurde durch die Aktivierung mit 136 nmol/l Thrombin eine FXIa-Spitzenkonzentration von $318,78 \pm 17,08$ pmol/l erreicht. In dem Vergleichsansatz mit 13,6 nmol/l Thrombin betrug die FXIa-Spitzenkonzentration lediglich $58,80 \pm 25,31$ pmol/l.

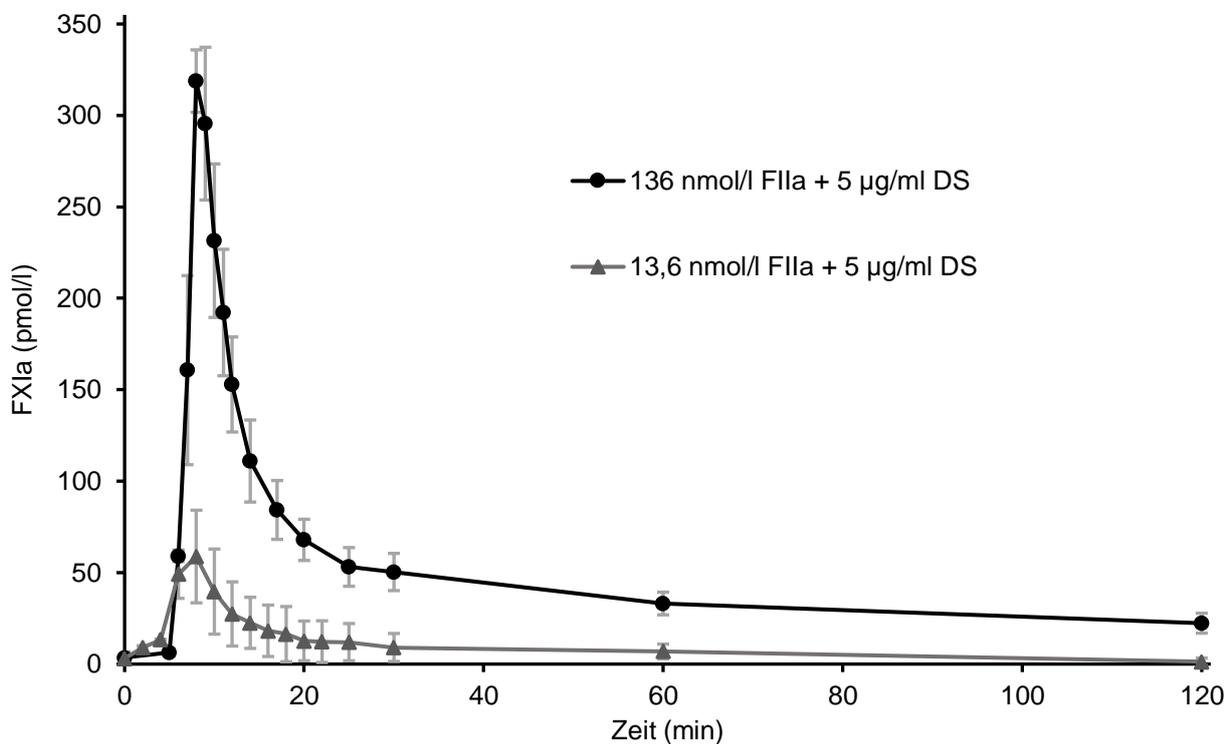


Abb. 16: Repräsentative FXIa-Generierungskurve nach Aktivierung durch Thrombin und Dextransulfat in normalem Poolplasma (NPP)

Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels ECA gemessenen FXIa-Konzentrationen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Aktivierung durch Thrombin (● 5 µg/ml = 136 nmol/l, ▲ 0,5 µg/ml = 13,6 nmol/l, FIIa) und Dextransulfat (5 µg/ml, DS) in NPP. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken abgebildet (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

3.2.3 FXIa-Generierung in vitro in FXI-Mangelplasma

Um das Verhältnis zwischen FXI im Plasma und der generierten FXIa-Menge zu analysieren, wurde eine FXI-Aktivierung in Plasmaproben von insgesamt sieben Hämophilie-C-Patienten sowohl kontaktphasen- als auch thrombininduziert durchgeführt. Die FXI-Restaktivitäten lagen bei diesen Patienten zwischen 8 % und 63 %. Die Patientenmerkmale und die zugrunde liegenden Mutationen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Patienten mit angeborenem FXI-Mangel (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022)

Nr.	FXI-Aktivität (%)	Alter (Jahre)	Geschlecht	F11 Genmutation	Proteinaustausch
1	8	28	Männlich	c.[1443delT];[901T>C]	p.Ile481Metfs*4;Phe301Leu
2	52	55	Männlich	c.[976C>T];[=]	p.Arg326Cys
3	63	27	Weiblich	c.[41C>T];[=]	p.Thr14Ile
4	51	46	Männlich	c.[943G>A];[=]	p.Glu315Lys
5	36	9	Weiblich	c.[943G>A];[=]	p.Glu315Lys
6	45	9	Weiblich	c.[943G>A];[=]	p.Glu315Lys
7	39	59	Weiblich	c.[1489C>T];[=]	p.Arg497*

In Abb. 17 sind beispielhaft die FXIa-Generierungskurven in NPP und in Plasmaproben zweier Hämophilie-C-Patienten mit einer FXI-Restaktivität von 63 % (Nr. 3) bzw. 45 % (Nr. 6) nach Kontaktaktivierung und nach der Aktivierung durch Thrombin und Dextransulfat in einer Konzentration von jeweils 5 µg/ml dargestellt.

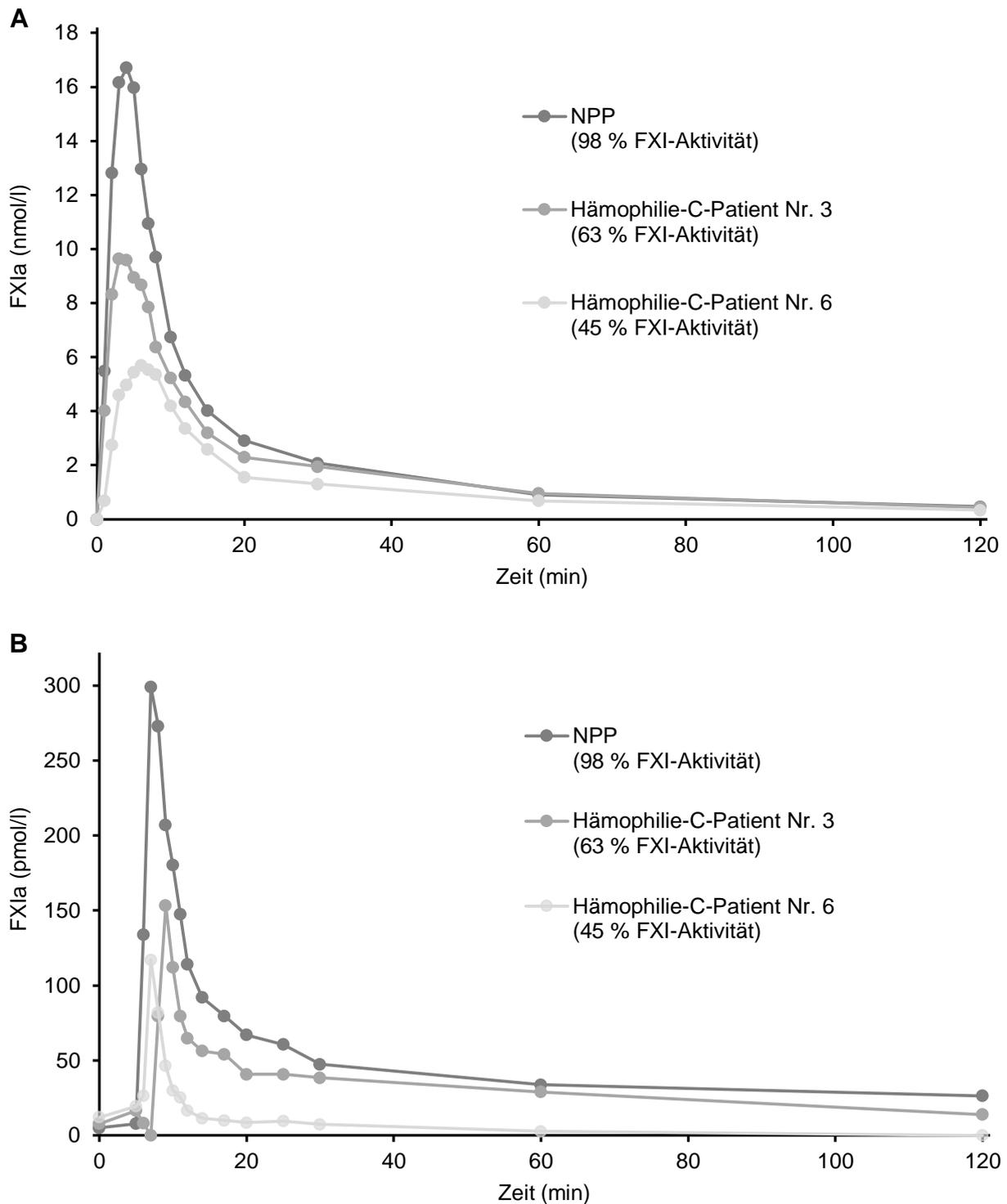


Abb. 17: Morphologie der FXIa-Generierungskurven im Vergleich zwischen normalem Poolplasma (NPP) und FXI-Mangelplasma
(A) FXIa-Generierungskurven nach Kontaktaktivierung in NPP und in Plasma der Hämophilie-C-Patienten Nr. 3 und Nr. 6. **(B)** FXIa-Generierungskurven nach Aktivierung durch Thrombin und Dextransulfat (jeweils 5 µg/ml) in NPP und in Plasma der Hämophilie-C-Patienten (Eigene Darstellung).

Wie in Abb. 18 dargestellt, gab es eine gleichermaßen hohe Korrelation zwischen der relativen Änderung der AUC in Abhängigkeit von der FXI-Restaktivität sowohl bei der Kontaktaktivierung (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r = 0,969$) als auch bei der thrombininduzierten Aktivierung von FXI ($r = 0,982$).

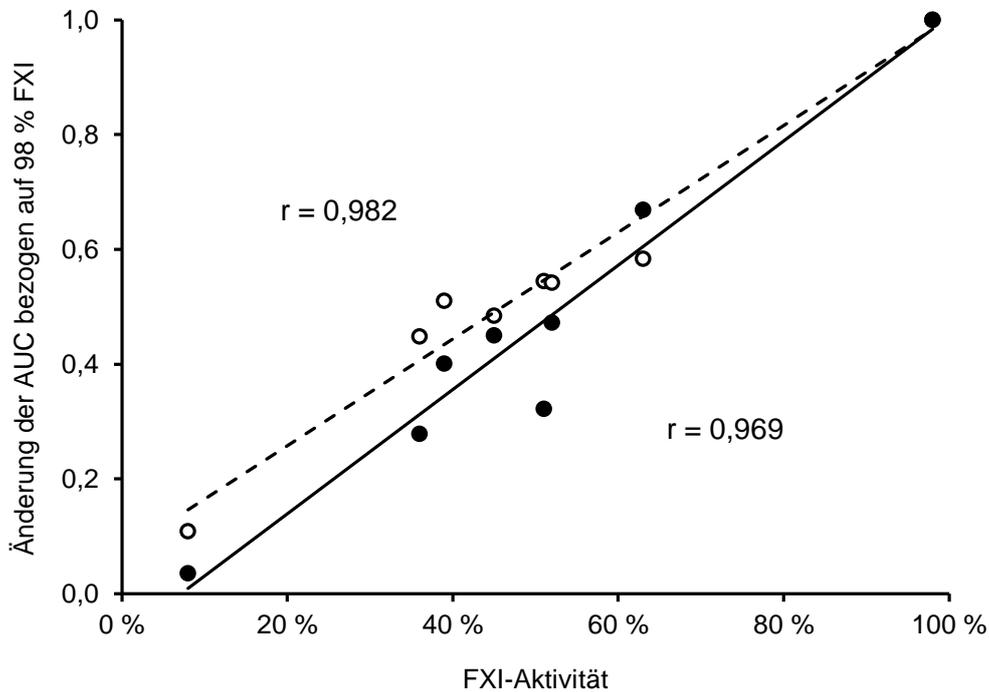
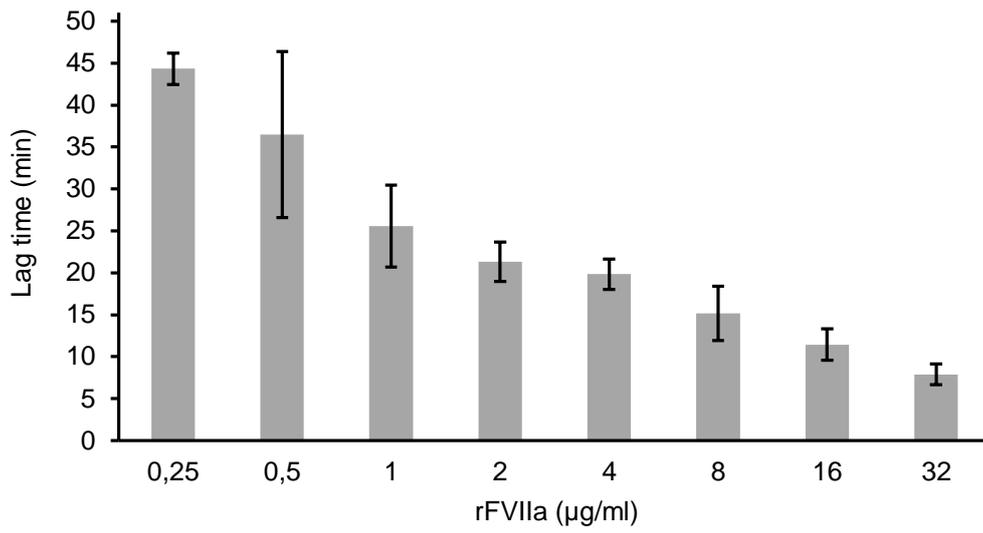
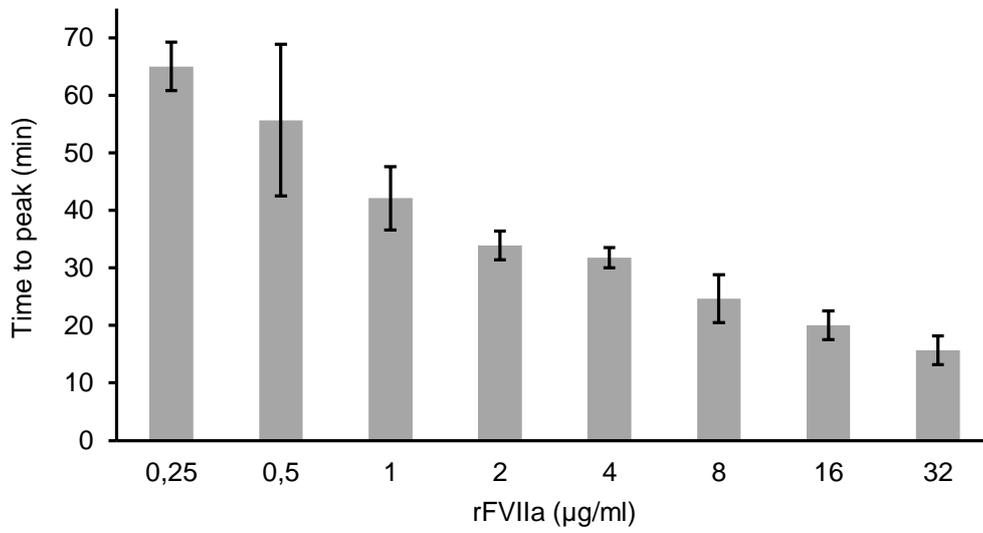
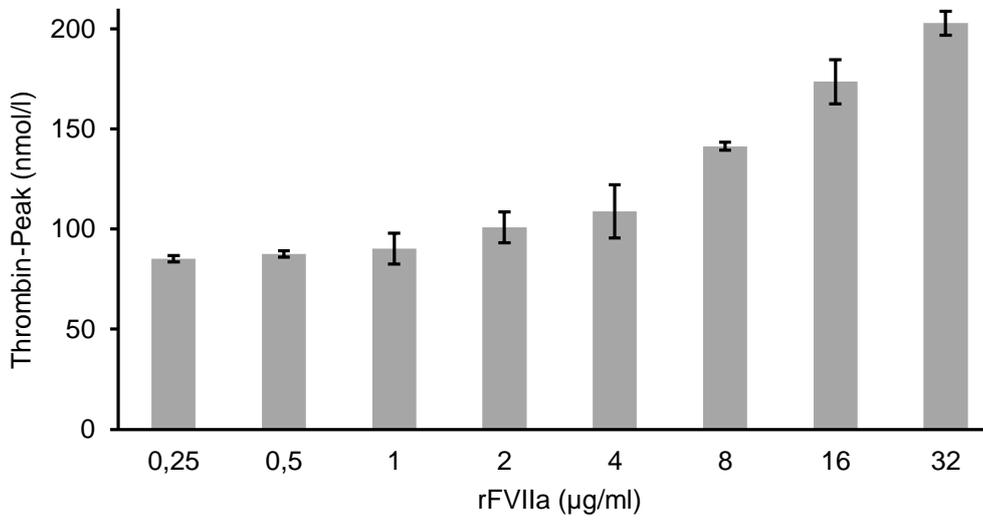


Abb. 18: Korrelation zwischen der generierten FXIa-Menge und der FXI-Restaktivität im Plasma von Hämophilie-C-Patienten

Die FXIa-Generierung erfolgte entweder durch Kontaktaktivierung (●, durchgezogene Linie) oder durch Thrombin und Dextransulfat (○, gestrichelte Linie) in Citratplasma von sieben Hämophilie-C-Patienten mit einer FXI-Restaktivität zwischen 8 und 63 %. Die Datenpunkte stellen die relative Änderung der AUC in Bezug zu normalem Poolplasma in Abhängigkeit von der FXI-Restaktivität dar. Außerdem sind die entsprechenden Regressionskurven und Pearson-Korrelationskoeffizienten abgebildet (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

3.3 rFVIIa-induzierte Thrombingenerierung in vitro

Um die für eine Gerinnungsaktivierung in vivo nötige rFVIIa-Dosierung zu ermitteln, wurde eine In-vitro-Thrombingenerierung durch rFVIIa im Konzentrationsbereich zwischen 0,25 und 32 $\mu\text{g/ml}$ im CAT-Assay initiiert (Abb. 19).

A**B****C**

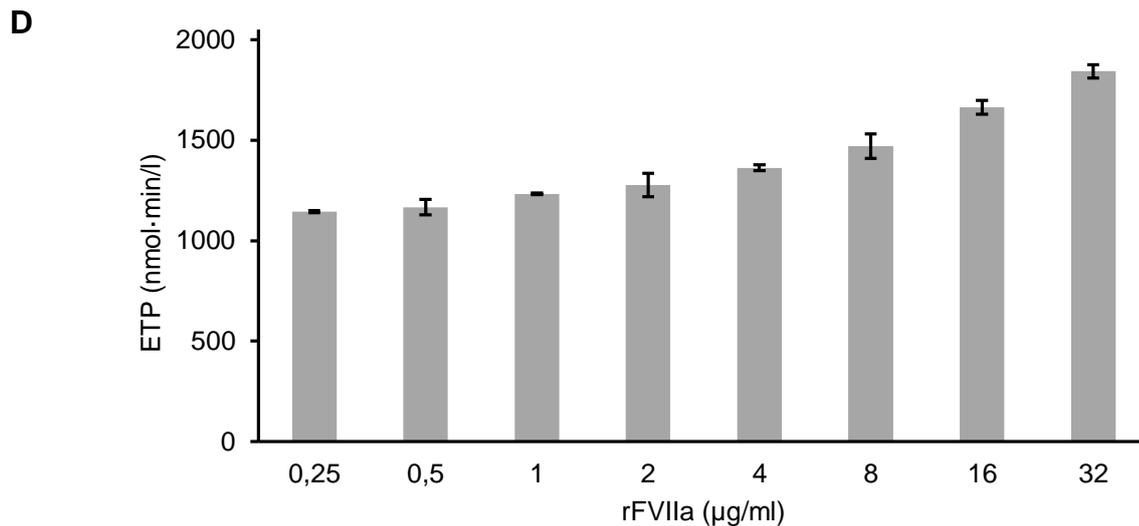


Abb. 19: In-vitro-Thrombingenerierung durch rFVIIa

Dargestellt sind die Verzögerungszeit bis zum Anstieg der Thrombinkonzentration (Lag time, **A**), die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Thrombinkonzentration (Time to peak, **B**), die maximale Thrombinkonzentration (Thrombin-Peak, **C**) und die Area Under the Curve (AUC, entspricht endogenem Thrombinpotenzial ETP, **D**) nach Initiation der Thrombingenerierung in gepooltem plättchenreichem Plasma (150.000 Thrombozyten/µl) durch verschiedene Konzentrationen rFVIIa im Calibrated Automated Thrombogram-Assay (CAT-Assay). Mittelwerte sind als Säulen und Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Mit zunehmender rFVIIa-Dosis reduzierte sich die mittlere Verzögerungszeit bis zum Anstieg der Thrombinkonzentration (Lag time) von 44 Minuten bei einer rFVIIa-Konzentration von 250 ng/ml auf 8 Minuten bei einer rFVIIa-Konzentration von 32 µg/ml. Die mittlere Zeit bis zur maximalen Thrombinkonzentration (Time to peak) verkürzte sich von 65 Minuten auf 16 Minuten. Die mittlere maximale Thrombinkonzentration stieg von 85 nmol/l auf 203 nmol/l an. Das mittlere endogene Thrombinpotenzial (ETP = AUC) vergrößerte sich von 1144 nmol·min·L⁻¹ auf 1842 nmol·min·L⁻¹.

In früheren klinischen Studien waren nach der intravenösen Gabe von 15 µg/kg rFVIIa bei gesunden Probanden nach 10 Minuten rFVIIa-Plasmakonzentrationen von 250 ng/ml messbar (Rühl et al., 2018; Rühl et al., 2019). In den In-vitro-Thrombingenerierungsversuchen induzierte bereits die niedrigste getestete rFVIIa-Konzentration von 250 ng/ml ausreichend hohe Thrombinkonzentrationen, um auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2 in Gegenwart von Dextransulfat eine messbare FXIa-Generierung in vitro auslösen zu können. Entsprechend sollte eine rFVIIa-Dosierung von 15 µg/kg ausreichen, um in vivo eine messbare thrombinabhängige Aktivierung von FXI auszulösen.

3.4 Thrombin- und FXIa-Bildung in vivo

Im folgenden Kapitel wird die Untersuchung der vermuteten Korrelation zwischen der Thrombin- und der FXIa-Bildung nach einer In-vivo-Gerinnungsaktivierung durch die intravenöse rFVIIa-Gabe oder durch ein chirurgisches Trauma dargestellt.

3.4.1 Probandenmerkmale in der SHAPE-Kohorte

Die SHAPE-Kohorte umfasste insgesamt 79 Probanden, hierunter 28 gesunde Kontrollpersonen und 51 Träger der prothrombotischen Mutationen FVL (n = 26) und Prothrombin 20210G>A (n = 25). In der gesamten Kohorte befanden sich 34 Probanden mit einer VTE in der Vorgeschichte (VTE+, 62 % Mutationsträger) und 45 Probanden mit diesbezüglich blander Vorgeschichte (VTE-, 67 % Mutationsträger). Die Probandenmerkmale der Kohorte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab 3: Probandenmerkmale in der SHAPE-Kohorte

SHAPE: Stimulated Hemostasis Activity Pattern Evaluation; VTE-: keine venöse Thromboembolie (VTE) in der Vorgeschichte; VTE+: VTE in der Vorgeschichte; BMI: Body-Mass-Index; SD: Standardabweichung; FVL: Faktor-V-Leiden-Mutation; FII 20210G>A: Prothrombinmutation 20210G>A; * davon homozygote Mutationsträger (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022)

	VTE-, n = 45	VTE+, n = 34
Alter (Mittelwert±SD), Jahre	36±12	39±12
Geschlecht (männlich/weiblich), n	15/30	12/22
BMI (Mittelwert±SD), kg/m ²	22,5±3,0	24,1±2,0
FVL Träger, n	17 (3*)	9 (1*)
FII 20210G>A Träger, n	13 (2*)	12

Die vorab im BCS[®]-XP-Analyzer gemessenen Aktivitätsspiegel von FII, FVII, FXI, AT, PC sowie die Plasmakonzentration des freien PS lagen bei allen Probanden im jeweiligen Normbereich.

3.4.2 Pharmakokinetik von rFVIIa

Die intravenöse Gabe von 15 µg/ml rFVIIa wurde von allen Probanden gut toleriert. Es traten während der gesamten Überwachungszeit von insgesamt 8 Stunden keine unerwünschten Ereignisse auf.

Abb. 20 zeigt, dass das pharmakokinetische Profil von rFVIIa sowohl bei den „VTE+“ - als auch bei den „VTE-“ -Probanden mit medianen Spitzenwerten der FVIIa-Konzentration von 0,23 µg/ml (VTE+), beziehungsweise von 0,22 µg/ml (VTE-) nach 10 Minuten nahezu identisch waren.

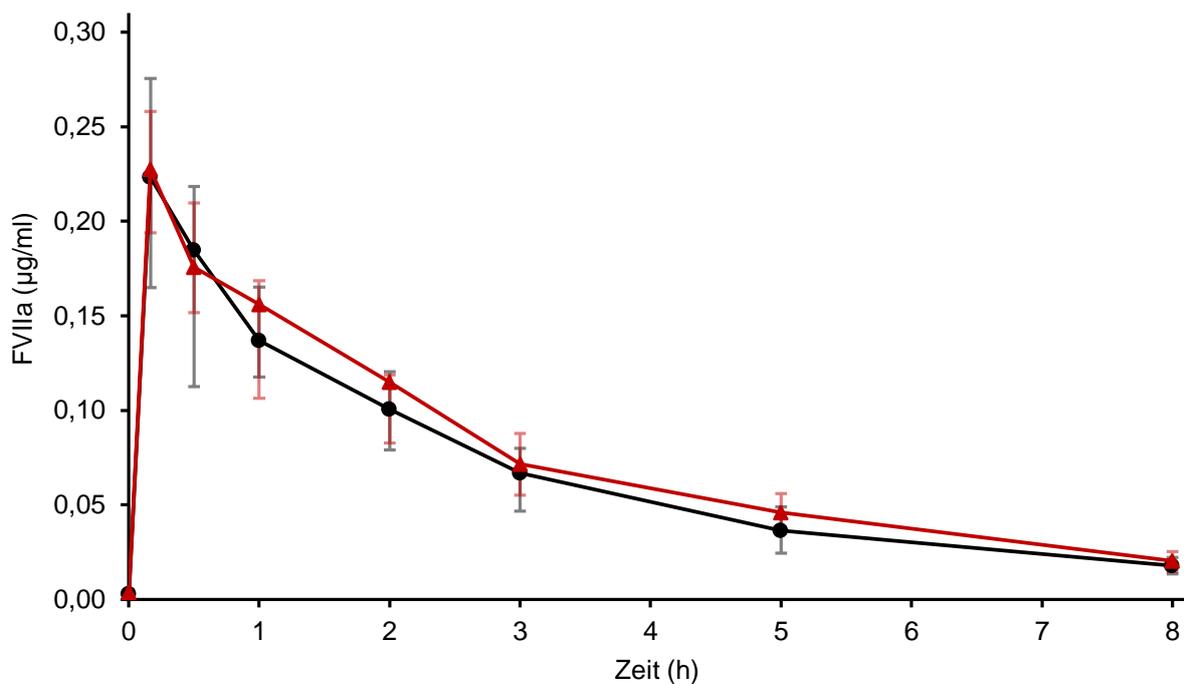
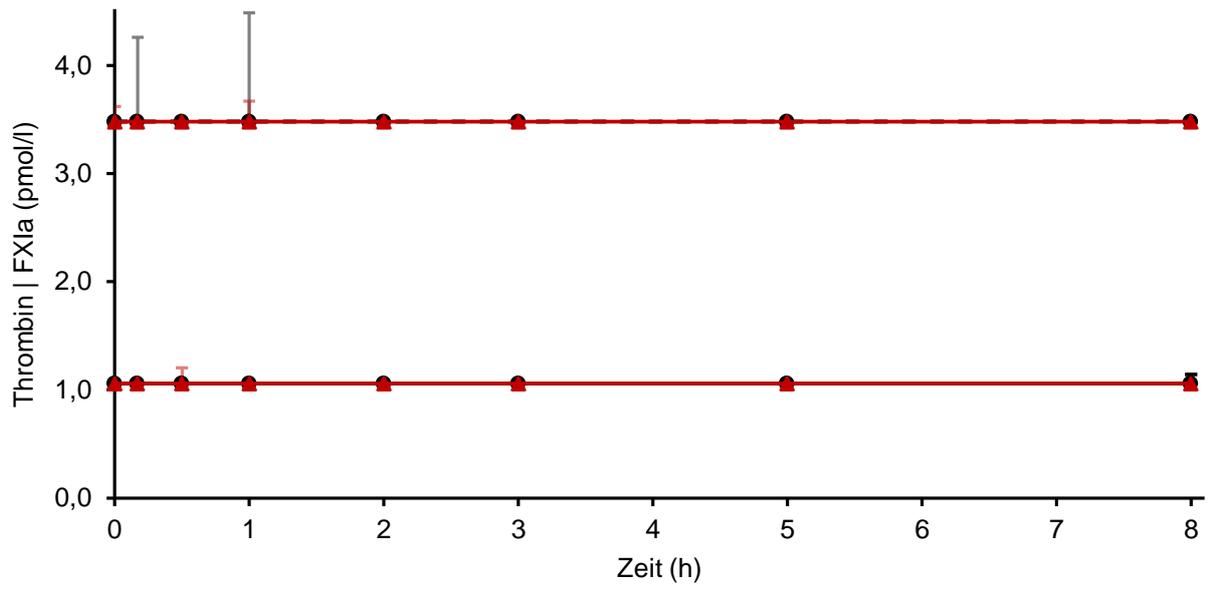
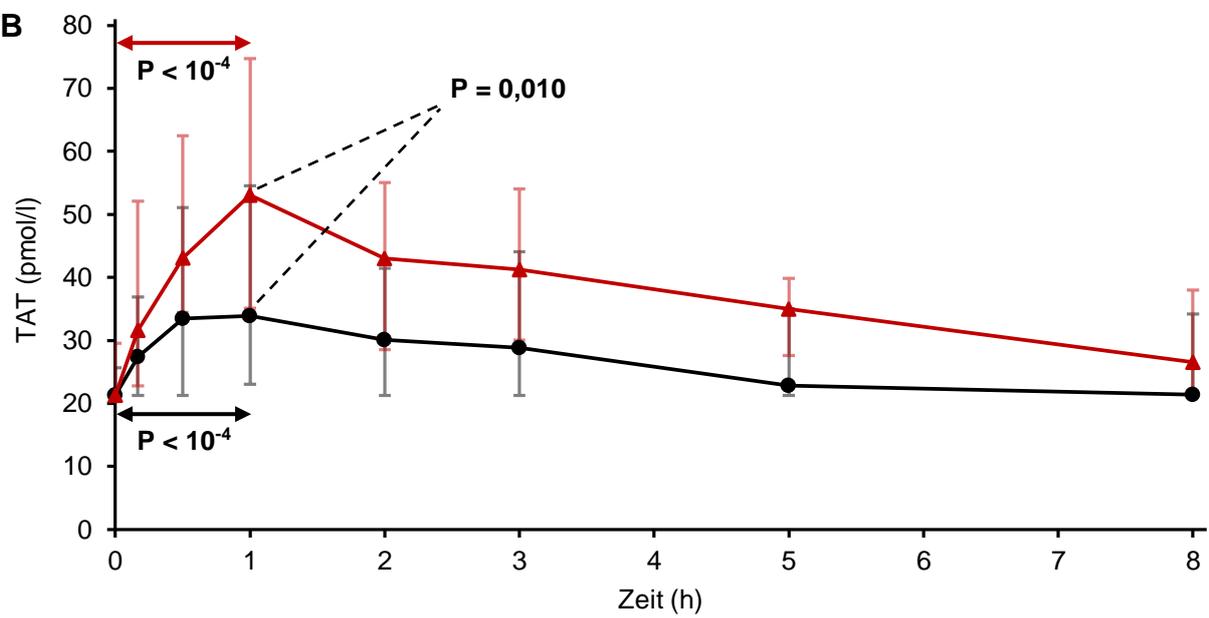


Abb. 20: Pharmakokinetisches Profil von rFVIIa

Dargestellt sind die Medianwerte der gemessenen FVIIa-Plasmaspiegel vor ($t = 0$) und nach der intravenösen Gabe von 15 µg/kg rekombinanten FVIIa zu den angegebenen Zeitpunkten sowohl bei Probanden mit (\blacktriangle , $n = 34$, VTE+) als auch bei Probanden ohne (\bullet , $n = 45$, VTE-) venöse Thromboembolie in der Vorgeschichte. Die Interquartilbereiche sind als Fehlerbalken dargestellt (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

3.4.3 Kinetik der FXIa- und Thrombinbildung in der SHAPE-Kohorte

Trotz des Anstiegs der indirekten Thrombinbildungsmarker blieben die medianen Plasmaspiegel sowohl von Thrombin als auch von FXIa zu allen Messzeitpunkten nach der intravenösen Gabe von 15 µg/ml rFVIIa unterhalb der jeweiligen unteren Bestimmungsgrenze (Abb. 21).

A**B**

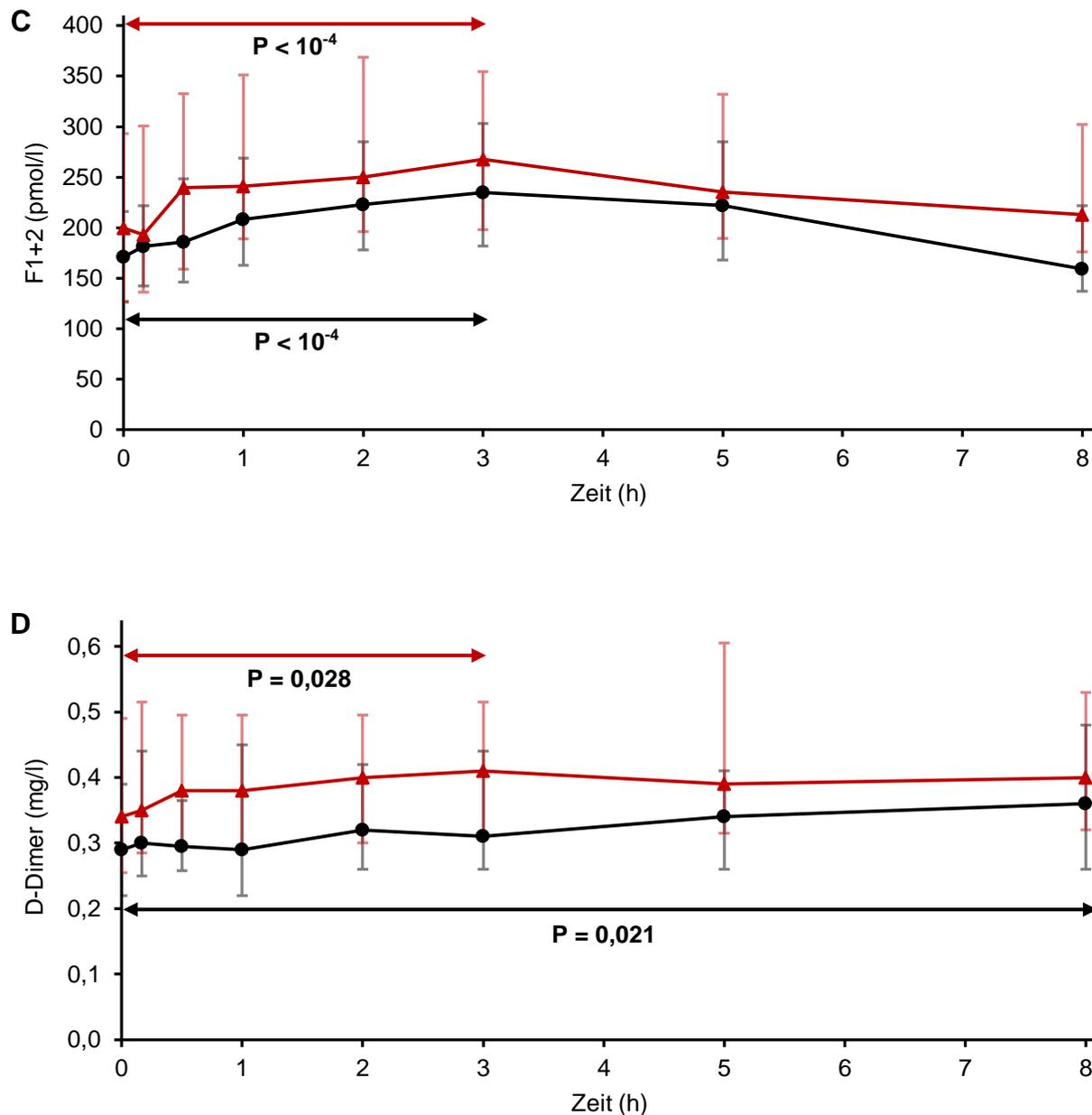


Abb. 21: rFVIIa-induzierte Veränderung verschiedener Biomarker der Hämostase in vivo. Abgebildet sind die Medianwerte von FXIa und Thrombin (A), TAT (B), F1+2 (C) und D-Dimer (D) vor ($t = 0$) und nach der intravenösen Gabe von $15 \mu\text{g/kg}$ rekombinanten FVIIa zu den angegebenen Zeitpunkten sowohl bei Probanden mit (\blacktriangle , $n = 34$, VTE+) als auch bei Probanden ohne (\bullet , $n = 45$, VTE-) venöse Thromboembolie in der Vorgeschichte. Die Interquartilbereiche sind als Fehlerbalken abgebildet. Pfeile zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Ausgangs- und Maximalkonzentration an, die P-Werte sind jeweils angegeben. In (B) ist zusätzlich der signifikante Unterschied zwischen der „VTE+“- und der „VTE“-Untergruppe durch eine gestrichelte Linie markiert (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Die medianen Plasmaspiegel von F1+2 stiegen signifikant von dem Ausgangswert 171 pmol/l auf eine Maximalkonzentration von 235 pmol/l bei den „VTE-“-Probanden und von 200 pmol/l auf 268 pmol/l bei den „VTE+“-Probanden an ($P < 0,001$). Zwischen beiden Untergruppen gab es für den Anstieg von F1+2 keine signifikanten Unterschiede. Die medianen TAT-Spiegel stiegen signifikant von $< 21,3$ pmol/l auf maximal 33,9 pmol/l bei den „VTE-“-Probanden und von $< 21,3$ pmol/l auf 53,1 pmol/l bei den „VTE+“-Probanden an ($P < 0,001$). Die Differenz zwischen der Ausgangs- und Maximalkonzentration von TAT war bei den „VTE+“-Probanden signifikant größer als bei den „VTE-“-Probanden ($P = 0,010$). Es konnte ein geringer, aber statistisch signifikanter Anstieg der medianen D-Dimer-Konzentration von 0,29 mg/l auf 0,36 mg/l in der „VTE-“-Untergruppe ($P = 0,021$) und von 0,34 mg/l auf 0,41 mg/l in der „VTE+“-Untergruppe ($P = 0,028$) beobachtet werden.

3.4.4 Probandenmerkmale in der OP-Kohorte

Die Kohorte umfasste 35 Patienten, die sich einer elektiven orthopädischen OP unterzogen. Darunter waren 21 Patienten männlich und 14 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug $50,5 \pm 17,4$ Jahre. Der durchschnittliche BMI lag bei $26,4 \pm 2,6$ kg/m².

Die vorab im BCS[®]-XP-Analyzer gemessenen Gerinnungsparameter TPZ, aPTT, FII, FVII, PC und AT lagen bei allen Patienten präoperativ im jeweiligen Normbereich.

Die untersuchten operativen Eingriffe umfassten 13 Nukleotomien, 4 Hüft-Totalendoprothesen (TEP), 8 arthroskopische Eingriffe, 5 Osteosynthesen und 5 Implantatentfernungen. Gemäß den vom American College of Cardiology und der American Heart Association veröffentlichten Richtlinien für die perioperative Versorgung wurden die OPs in Abhängigkeit von Art, Dauer, Blutverlust und Transfusionspflichtigkeit in größere und kleinere Eingriffe eingeteilt (Fleisher et al., 2015; Friedrich et al., 2018). Die Merkmale der OP-Kohorte sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Demographische und klinische Daten der OP-Kohorte mit größerem (A) und kleinerem (B) operativem Eingriff

TEP: Totalendoprothese; ORIF: Offene Reposition und osteosynthetische Fixierung; VKB: Vorderes Kreuzband; ASK: Arthroskopie (Modifiziert übernommen aus Friedrich et al., 2018)

A

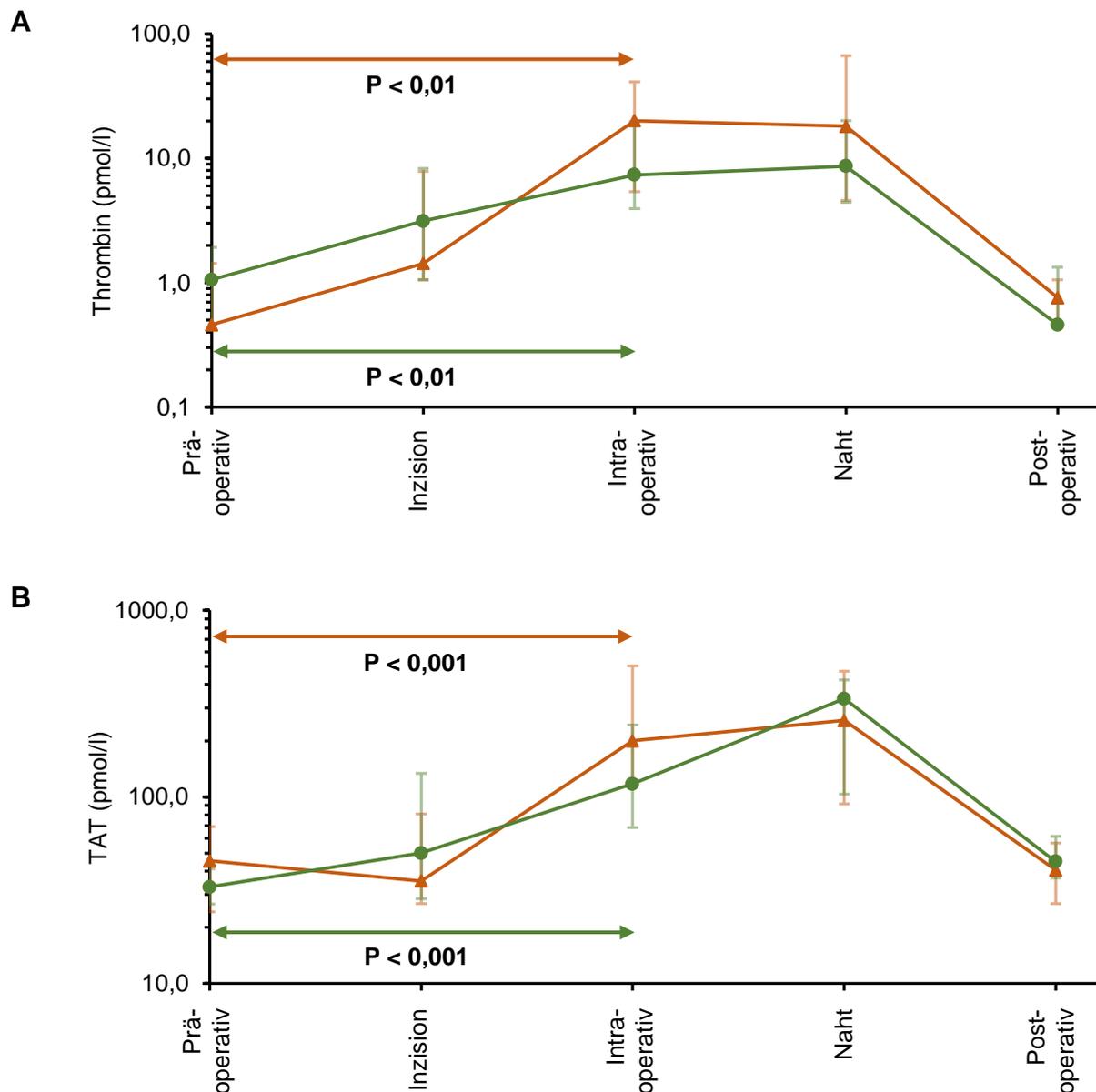
Geschlecht	Alter (Jahre)	Art des Eingriffs	OP-Zeit (Min)	Blutverlust (ml)	Erythrozytenkonzentrate
Weiblich	69	Hüft-TEP	94	350	2
Männlich	40	Hüft-TEP	106	400	0
Männlich	70	Hüft-TEP	108	250	0
Weiblich	70	Hüft-TEP	85	500	2
Männlich	82	Spondylodese	281	600	0
Weiblich	48	Nukleotomie	98	50	0
Weiblich	58	Spondylodese	229	450	1
Männlich	48	Nukleotomie	233	110	0
Männlich	51	Nukleotomie	100	100	0
Weiblich	27	Spondylodese	98	250	0
Männlich	30	ORIF bei Radiuskopffraktur	182	80	0
Männlich	36	VKB-Rekonstruktion	100	0	0
Männlich	65	Subtalare Arthrodesse	324	150	1
Weiblich	26	VKB-Rekonstruktion	112	0	0
Männlich	29	VKB-Rekonstruktion	130	0	0
Männlich	34	ORIF bei Kalkaneusfraktur	180	200	0
Männlich	65	Spondylodese	425	1500	4

B

Geschlecht	Alter (Jahre)	Art des Eingriffs	OP-Zeit (Min)	Blutverlust (ml)	Erythrozytenkonzentrate
Weiblich	58	Implantatentfernung Hüfte	74	150	0
Männlich	62	Kyphoplastie	25	0	0
Weiblich	86	Kyphoplastie	32	0	0
Männlich	28	ASK und ORIF dist. Radius	124	50	0
Weiblich	24	ASK Schulter	60	0	0
Weiblich	77	Kyphoplastie	67	0	0
Männlich	34	Implantatentfernung Bein	110	50	0
Männlich	45	Implantatentfernung Arm	100	0	0
Männlich	37	Implantatentfernung Bein	90	0	0
Männlich	35	ASK Knie	36	0	0
Männlich	57	ORIF bei Fibulafraktur	27	0	0
Männlich	58	Fingeramputation	36	0	0
Weiblich	63	Kyphoplastie	23	0	0
Weiblich	64	ASK Knie	52	0	0
Weiblich	47	Dekompression	105	50	0
Männlich	35	ORIF bei Klavikulafraktur	61	0	0
Weiblich	62	Kyphoplastie	43	0	0
Weiblich	62	Kyphoplastie	19	0	0

3.4.5 Aktivierungskinetik verschiedener pro- und antikoagulatorischer Parameter in der OP-Kohorte

Im Rahmen der 2018 veröffentlichten Studie wurden bereits die Plasmakonzentrationen von Thrombin, F1+2, TAT und D-Dimer zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach den operativen Eingriffen bestimmt (Friedrich et al., 2018). Diese Daten sind in Abb. 22 dargestellt.



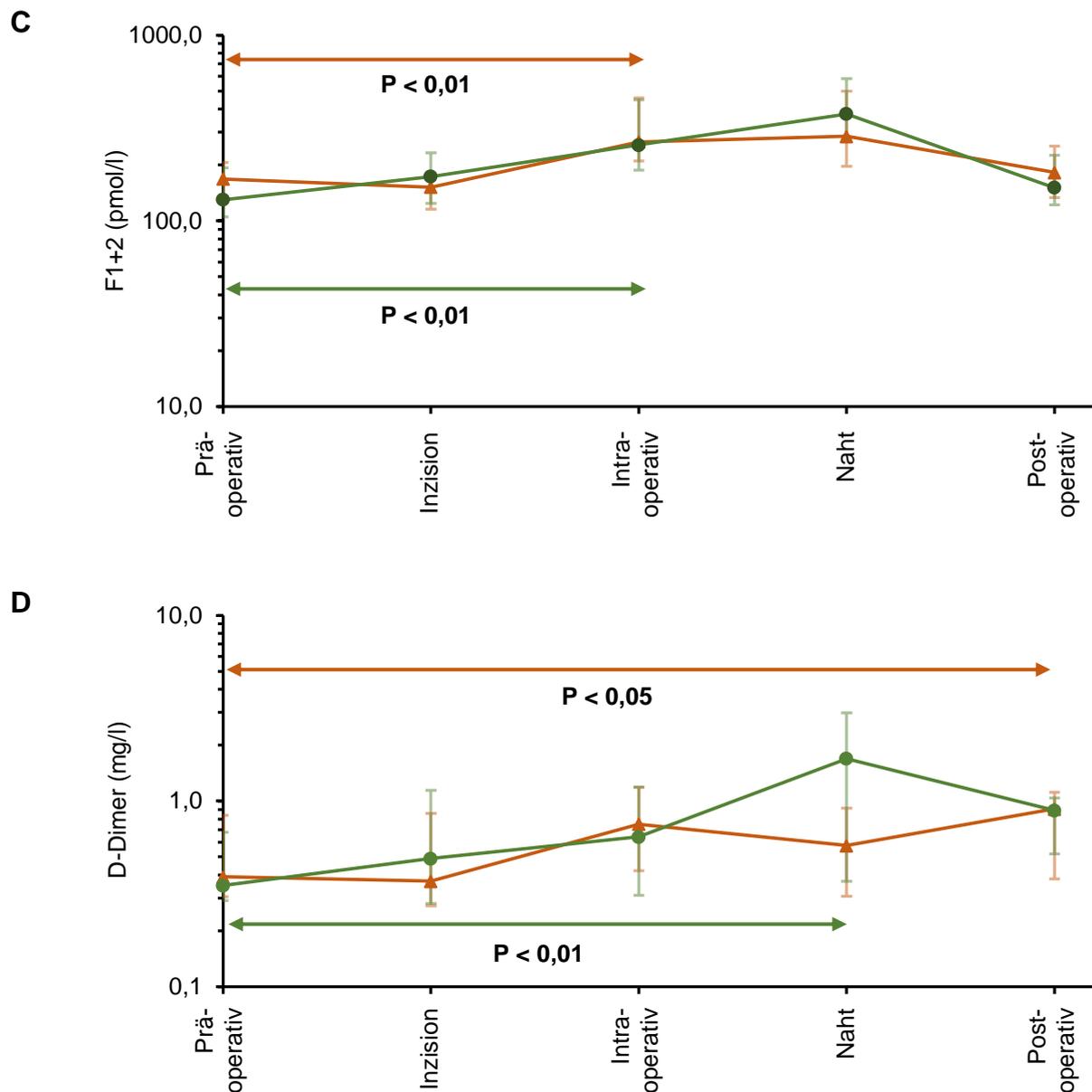


Abb. 22: Anstieg verschiedener Biomarker der Hämostase in vivo während orthopädischer Operationen

Die Datenpunkte stellen die Medianwerte und die Fehlerbalken die Interquartilbereiche der gemessenen Biomarker Thrombin (A), TAT (B), F1+2 (C) und D-Dimer (D) vor, während und 24 Stunden nach elektiven orthopädischen Operationen dar. Unterschieden wurde zwischen größeren (● n = 17) und kleineren (▲ n = 18) Eingriffen. Die Pfeile zeigen einen erstmalig signifikanten Konzentrationsanstieg vom Ausgangswert an, die P-Werte sind jeweils angegeben (Modifiziert übernommen aus Friedrich et al., 2018).

Wie dargestellt, zeigte sich intraoperativ zur OP-Halbzeit ein signifikanter Anstieg der prokoagulatorischen Biomarker Thrombin, TAT und F1+2, sowohl bei Patienten mit einem kleineren als auch bei Patienten mit einem größeren operativen Eingriff. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den medianen Plasmakonzentrationen von Thrombin, TAT und F1+2 in beiden Untergruppen mit größerem oder kleinerem operativem Eingriff festgestellt werden. Lediglich die D-Dimere zeigten eine abweichende Dynamik. Hier zeigte sich bei den Patienten mit größerem operativem Eingriff zum Zeitpunkt der Hautnaht ein signifikanter Konzentrationsanstieg, während bei den Patienten mit kleinerem Eingriff erst 24 Stunden nach der Operation ein signifikanter Anstieg erreicht wurde. Die D-Dimer-Spiegel waren in beiden Untergruppen noch 24 Stunden nach der Operation signifikant erhöht, während die übrigen Biomarker in beiden Untergruppen nach 24 Stunden wieder den Ausgangswert erreichten. Die maximal erreichten Konzentrationen waren bei allen untersuchten Markern unabhängig vom jeweiligen Ausgangswert (Friedrich et al., 2018).

3.4.6 Aktivierungskinetik von FXIa in der OP-Kohorte

Die durch das chirurgische Trauma induzierte systemische Gerinnungsaktivierung führte zu einem schnellen und langanhaltenden Anstieg der FXIa-Plasmakonzentration. Zum Zeitpunkt der Inzision stieg die mediane Konzentration bereits von dem Ausgangswert 3,9 pmol/l in der Untergruppe mit kleinerem Eingriff, bzw. 3,69 pmol/l in der Untergruppe mit größerem Eingriff auf 6,72 pmol/l, bzw. 7,75 pmol/l an, wobei diese Differenz statistisch noch nicht signifikant war. Zur OP-Halbzeit und zum Zeitpunkt der Hautnaht lagen die medianen FXIa-Konzentrationen bei 9,53 und 9,16 pmol/l in der Untergruppe mit kleinerem Eingriff, bzw. 9,38 und 11,63 pmol/l in der Untergruppe mit größerem Eingriff und damit in der OP-Kohorte insgesamt signifikant über dem Ausgangswert ($P = 0,001$ zur OP-Halbzeit, bzw. $P = 0,009$ zur Hautnaht). Auch 24 Stunden postoperativ blieben die medianen Plasmakonzentrationen signifikant auf 9,38 pmol/l, bzw. 9,94 pmol/l erhöht ($P = 0,001$). Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untergruppen mit größerem oder kleinerem Eingriff festgestellt werden. In Abb. 23 sind die Medianwerte und Interquartilbereiche der zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen FXIa-Konzentrationen dargestellt.

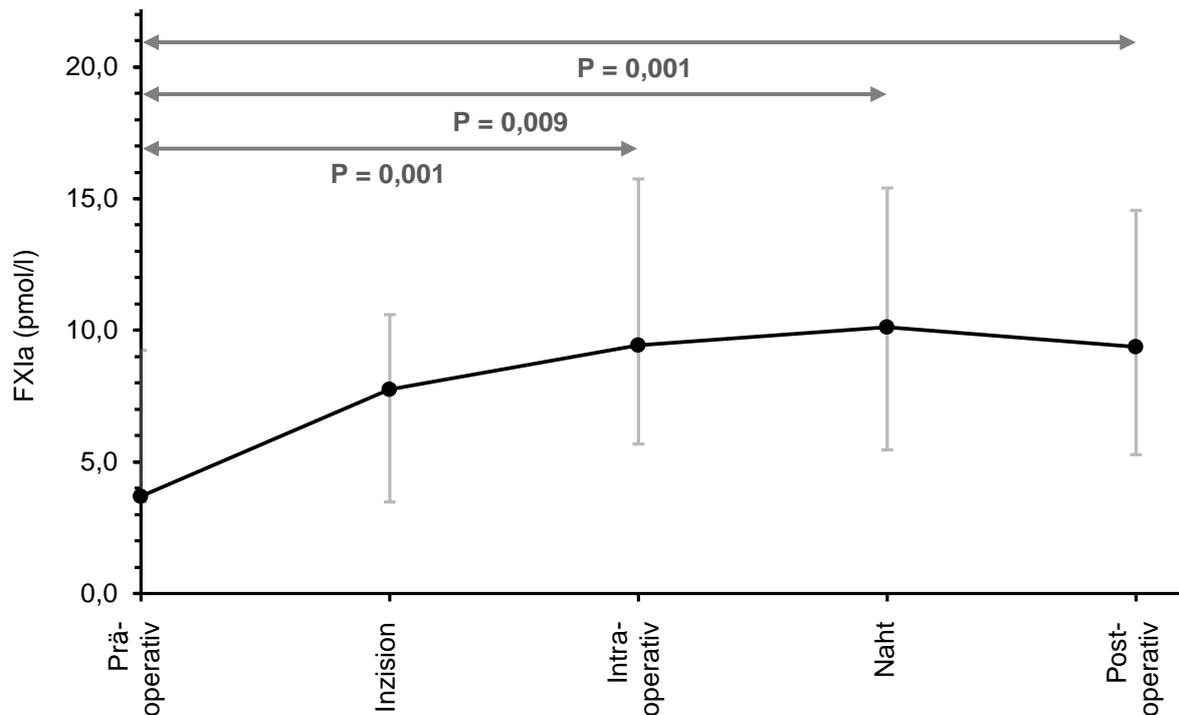
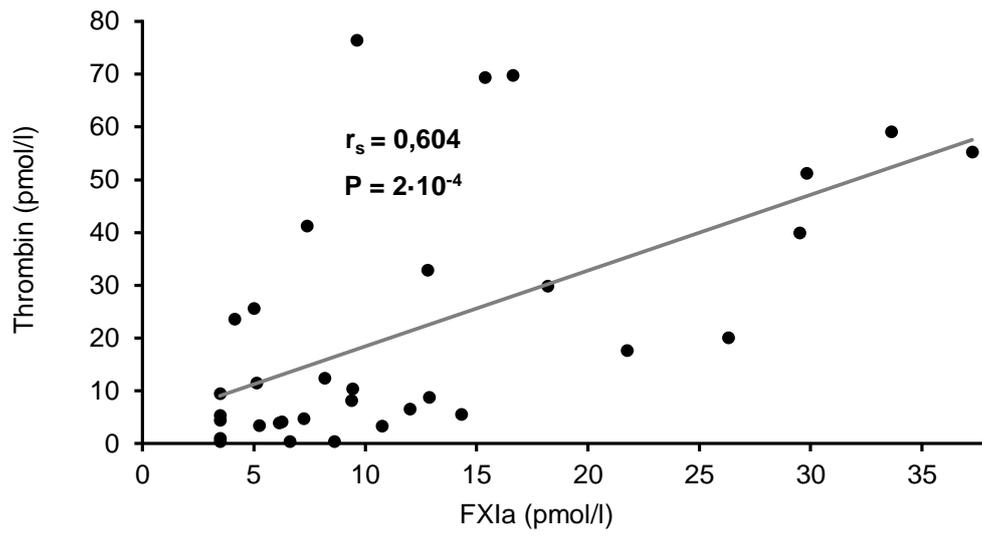


Abb. 23: Anstieg der FXIa-Konzentration in vivo während orthopädischer Operationen
Die Datenpunkte stellen die Medianwerte und die Fehlerbalken die Interquartilbereiche der FXIa-Konzentrationen vor, während und 24 Stunden nach 35 elektiven orthopädischen Operationen dar. Die Pfeile zeigen einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Vergleich zum Ausgangswert an, die P-Werte sind jeweils angegeben (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

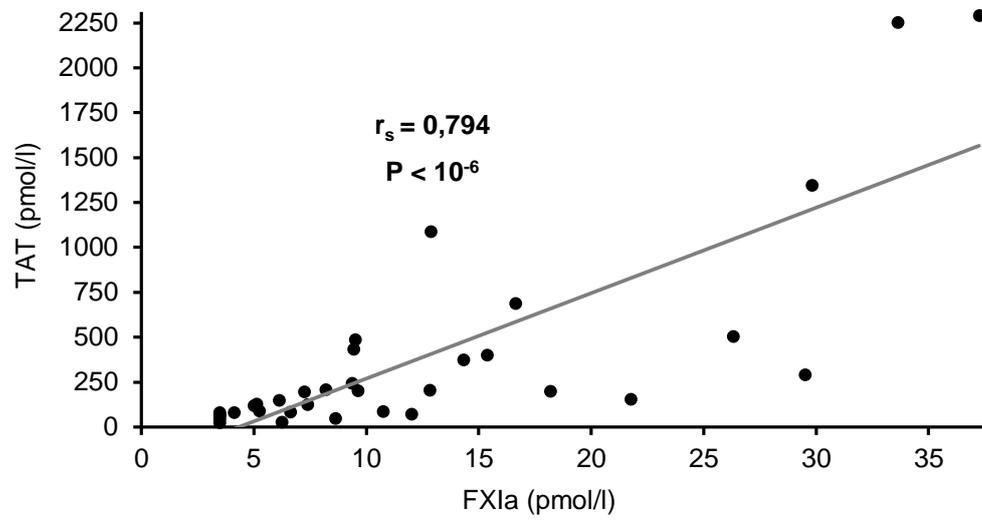
3.4.7 Korrelation zwischen dem Anstieg der Thrombin- und FXIa-Konzentration während operativer Eingriffe

Da es zur OP-Halbzeit bei den untersuchten Biomarkern FXIa, Thrombin, TAT, F1+2 und den D-Dimeren keinen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen beiden Untergruppen mit größerem und kleinerem Eingriff gab, wird die Kohorte in der folgenden Korrelationsauswertung der Übersichtlichkeit halber zusammengefasst (Abb. 24).

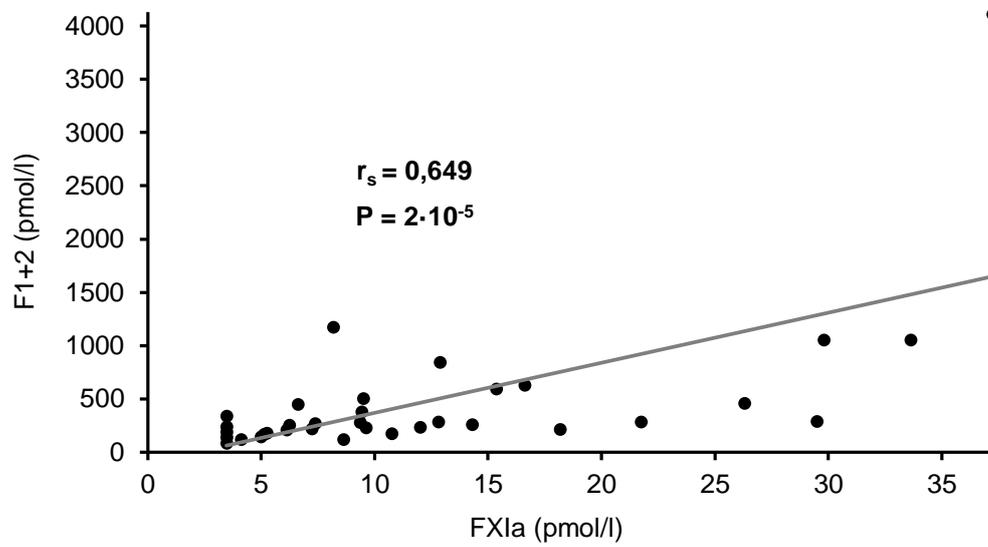
A



B



C



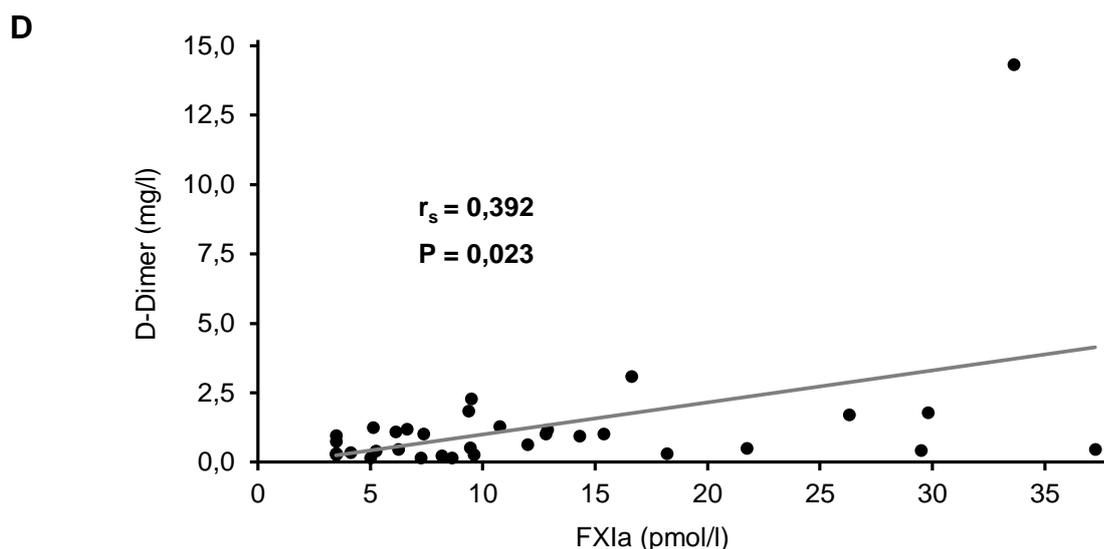


Abb. 24: Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von FXIa und weiteren Biomarkern der Hämostase zur OP-Halbzeit
Die Plasmakonzentrationen von Thrombin (**A**), TAT (**B**), F1+2 (**C**) und D-Dimer (**D**) sind in Korrelation zur FXIa-Konzentration bei 35 orthopädischen Operationen dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind Regressionskurven, Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten und assoziierte P-Werte (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Die Spearman-Analyse zeigte eine signifikante und positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von FXIa und den übrigen gemessenen Biomarkern, wobei die Korrelation mit TAT am stärksten war ($r_s = 0,794$; $P < 10^{-6}$). Die Korrelation mit F1+2 ($r_s = 0,649$; $P = 2 \cdot 10^{-5}$) und Thrombin ($r_s = 0,604$; $P = 2 \cdot 10^{-4}$) war moderat. Zwischen den FXIa- und den D-Dimer-Konzentrationen wurde eine schwache Korrelation errechnet ($r_s = 0,392$; $P = 0,023$).

3.4.8 Vergleich der Thrombin- und FXIa-Bildung in beiden klinischen Szenarien der Gerinnungsaktivierung in vivo

In Tab. 5 sind die Ergebnisse aus beiden klinischen Szenarien zusammengetragen. Für die OP-Kohorte sind die medianen Plasmakonzentrationen der Parameter FXIa, Thrombin, TAT, F1+2 und D-Dimer präoperativ und zur OP-Halbzeit angegeben. Für die SHAPE-Kohorte sind jeweils die medianen Ausgangs- und Maximalkonzentrationen der fünf Parameter sowohl bei der Untergruppe mit (VTE+) als auch bei der Untergruppe ohne VTE in der Vorgeschichte angegeben (VTE-).

Tab. 5: Vergleich der Konzentrationsanstiege verschiedener Biomarker nach Gerinnungsaktivierung in vivo

Verglichen werden die Medianwerte (und Interquartilbereiche) der Ausgangs- und Maximalkonzentrationen (SHAPE-Kohorte) bzw. der prä- und intraoperativen Konzentrationen (OP-Kohorte) verschiedener Biomarker der Hämostase im Plasma nach intravenöser Gabe von rFVIIa bzw. während elektiver orthopädischer Eingriffe.

† Die Referenzwerte wurden in einer Kohorte mit 15 gesunden Probanden ermittelt, wobei die Werte für F1+2, TAT und die D-Dimere bereits im Rahmen einer vorherigen Studie gemessen wurden (Rühl et al., 2019).

SHAPE: Stimulated Hemostasis Activity Pattern Evaluation; VTE-: keine venöse Thromboembolie (VTE) in der Vorgeschichte; VTE+: VTE in der Vorgeschichte.

Signifikante Konzentrationsanstiege im Vergleich zum Ausgangswert sind mit * ($P < 0,05$) oder ** ($P < 0,005$, zusätzlich fett markiert) versehen (Modifiziert übernommen aus Rühl et al., 2022).

Kohorte	Referenz- werte n = 15 †	Prä- vs. intraoperative Plasmakonzentration OP-Studie, n = 35	Basale vs. maximale Plasmakonzentration	
			SHAPE VTE-, n = 45	SHAPE VTE+, n = 34
FXIa, pmol/l	<3,48 (<3,48 - <3,48)	3,69 (<3,48 - 9,25) vs. 9,41 (5,47 - 15,94)**	<3,48 (<3,48 - <3,48) vs. <3,48 (<3,48 - 4,49)	<3,48 (<3,48 - 3,62) vs. <3,48 (<3,48 - 3,67)
Thrombin, pmol/l	<1,06 (<1,06 - <1,06)	<1,06 (<1,06 - 1,17) vs. 9,96 (4,39 - 30,68)**	<1,06 (<1,06 - <1,06) vs. <1,06 (<1,06 - 1,14)	<1,06 (<1,06 - <1,06) vs. <1,06 (<1,06 - 1,21)
TAT, pmol/l	<21,3 (<21,3 - <21,3)	33,5 (24,4 - 48,1) vs. 147,6 (78,5 - 266,8)**	<21,3 (<21,3 - 25,7) vs. 33,9 (23,0 - 54,6)**	<21,3 (<21,3 - 29,5) vs. 53,1 (35,1 - 74,8)**
F1+2, pmol/l	168 (106 - 225)	144 (118 - 171) vs. 253 (183 - 357)**	171 (127 - 216) vs. 235 (182 - 303)**	200 (126 - 293) vs. 268 (198 - 355)**
D-Dimer, mg/l	0,29 (0,24 - 0,34)	0,36 (0,29 - 0,68) vs. 0,58 (0,32 - 1,13)	0,29 (0,22 - 0,39) vs. 0,36 (0,26 - 0,48)*	0,34 (0,26 - 0,49) vs. 0,41 (0,31 - 0,52)*

4. Diskussion

Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass die Aktivierung von FXI sowohl während der physiologischen Hämostase als auch bei der pathologischen Thrombusbildung eine entscheidende Rolle spielt. In vitro konnte eine FXI-Aktivierung nicht nur durch die Kontaktfaktoren, sondern in Anwesenheit eines Kofaktors auch durch das zentrale Gerinnungsenzym Thrombin nachgewiesen werden. In vivo scheint die Kontaktaktivierung von FXI nicht physiologisch relevant für die Hämostase zu sein, da Menschen mit einem FXII-Mangel keine erhöhte Blutungsneigung zeigen (Puy et al., 2016a). Im Gegenteil gibt es in Tiermodellen sogar Hinweise dafür, dass die Kontaktaktivierung in vivo zu einer pathologischen Thrombusbildung führen kann (Cheng et al., 2010). In vivo scheint demnach ein anderes Enzym, zum Beispiel Thrombin, wesentlich relevanter für die physiologische FXI-Aktivierung zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass die Feedback-Aktivierung von FXI durch die zu Beginn der Gerinnungsaktivierung über den extrinsischen Signalweg generierten geringen Mengen Thrombin zu einer Verstärkung der Thrombinbildung und letztendlich zur Bildung eines stabilen Thrombus führt (Borne et al., 1995; Gailani und Broze, 1991). Allerdings sind der genaue Ablauf der thrombininduzierten FXI-Aktivierung und der physiologische Kofaktor bislang nicht bekannt. Um die Generierungsdynamik von FXIa und Thrombin nach einer Gerinnungsaktivierung in vivo beobachten zu können, bedarf es laboranalytischer Methoden, die eine rasche Elimination der beiden Enzyme durch endogene Inhibitoren verhindern und eine zuverlässige Bestimmung der Plasmakonzentrationen ermöglichen. Durch die parallele Analyse beider Enzymkonzentrationen könnten weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang der Thrombin- und FXIa-Bildung in vivo gewonnen werden. Eine Methode zur quantitativen Thrombinbestimmung nach Gerinnungsaktivierung in vivo wurde bereits in vorherigen Studien entwickelt und angewandt. Mit Hilfe des OECA ist es möglich, die Generierungsdynamik von Thrombin zu erfassen. Ein Assay zur quantitativen FXIa-Bestimmung wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

4.1 Anwendung des ECA zur Quantifizierung der FXIa-Generierung

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte FXIa-ECA ermöglicht eine sensitive und spezifische Bestimmung der FXIa-Konzentration. Mit einer unteren Bestimmungsgrenze von 3,48 pmol/l ist die analytische Sensitivität des FXIa-ECA vergleichbar mit der Sensitivität, die für einen auf der Thrombingenerierung basierenden Assay unter Verwendung eines inhibitorischen Anti-FXIa-Antikörpers angegeben wird (Loeffen et al., 2014; Loeffen et al., 2016). Allerdings bietet der FXIa-ECA den Vorteil, dass Benzamidin als kompetitiver Proteaseinhibitor verwendet werden kann, sodass eine Elimination von FXIa durch endogene Inhibitoren in der entnommenen Blutprobe verhindert wird. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Endkonzentration von 100 mmol/l Benzamidin zu einer deutlich erhöhten präanalytischen Stabilität von FXIa führt, ohne die Testergebnisse im ECA signifikant zu beeinflussen. Die gemessene FXIa-Aktivität betrug in Anwesenheit von Benzamidin nach einer 12-stündigen Lagerung der Plasmaprobe bei 4 °C noch 95 % des Ausgangswertes. Wurden die Proben unmittelbar nach der FXIa-Generierung mit dem Faktor 1:10 verdünnt, konnte sogar nach einer 48-stündigen Lagerung der Proben bei Raumtemperatur kein Verlust der FXIa-Aktivität festgestellt werden. Im Thrombingenerierungsassay hingegen würde die Zugabe von Benzamidin zu einer Hemmung des aktiven Zentrums von Thrombin und somit zu einer Störung der Messung führen. Die Spezifität des ECA für FXIa wurde bei einer Konzentration des an die Wells der Mikrotiterplatten gebundenen monoklonalen Anti-Human-FXI-Antikörpers AHXI-5061 von 4 µg/ml untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Zymogen FXI bei einer 1:10-Verdünnung der Proben keinen Einfluss auf die im ECA gemessene FXIa-Konzentration hatte.

Zur Evaluation der Reproduzierbarkeit des Assays wurden Plasmaproben mit unterschiedlichen bekannten FXIa-Konzentrationen dreifach an unterschiedlichen Tagen untersucht. Der Inter-Assay-Variationskoeffizient lag bei der niedrigsten gemessenen Konzentration von 1 pmol/l FXIa bei 17 %.

4.2 Unterschiede in der Aktivierungsdynamik von FXI in vitro nach Kontaktaktivierung und Aktivierung durch Thrombin

Um die Eignung des FXIa-ECA zur Quantifizierung des sowohl durch die Kontaktphase als auch durch Thrombin aktivierten FXI zu untersuchen, wurden zunächst mehrere FXIa-Generierungsversuche in vitro durchgeführt. Dazu wurde ein Assay entwickelt, mit dem die Aktivierungskinetik von FXI analysiert und verglichen werden konnte. Es ist bekannt, dass für die FXI-Aktivierung durch Thrombin ein negativ geladener Kofaktor nötig ist. In vitro wurde in früheren Studien unter anderem Dextransulfat als Kofaktor verwendet (Naito und Fujikawa, 1991). Die Identität des physiologischen Kofaktors ist bislang nicht abschließend geklärt. Von aktivierten Thrombozyten sezerniertes Polyphosphat wird als möglicher Kofaktor in vivo vermutet (Choi et al., 2011).

Erwartungsgemäß konnte weder mittels FXIa-ECA noch mittels Western-Blot-Analyse eine FXIa-Generierung durch Thrombin ohne Kofaktor nachgewiesen werden. Als mögliche Kofaktorkandidaten wurden Dextransulfat, Heparansulfat und Polyphosphat zunächst im gereinigten Puffersystem getestet, wobei unterschiedliche Polymerlängen des Polyphosphats verwendet wurden. Unter anderem wurde ein Polyphosphat mit einer Polymerlänge von 70 eingesetzt, welches dem von aktivierten Thrombozyten sezernierten Polyphosphat ähnelt. Lediglich bei dem Einsatz von Dextransulfat als Kofaktor wurde eine messbare Menge FXIa durch Thrombin generiert. Bei den getesteten Polyphosphaten kam es bei entsprechend hohen Konzentrationen zu Löslichkeitsproblemen, sodass in allen Folgeexperimenten Dextransulfat anstelle von Polyphosphat eingesetzt wurde. Es stellte sich heraus, dass die höchste FXIa-Konzentration im Plasma generiert wurde, wenn sowohl die Thrombinmenge als auch die Dextransulfatmenge der ungefähren FXI-Plasmakonzentration von 5 µg/ml entsprach. Mittels Western-Blot-Analyse wurde bewiesen, dass der Substratumsatz im ECA durch FXIa verursacht wurde. Dass die Aktivierung von FXI nicht fälschlicherweise durch die Kontaktphase erfolgte, belegten Experimente, bei denen es zu keiner FXIa-Generierung kam, wenn das Plasma den Thrombininhibitor Argatroban enthielt. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Hemmung der Kontaktphase durch CTI die durch Thrombin und Dextransulfat induzierte FXIa-Generierung nicht.

Um die Signalwegspezifität der FXI-Aktivierung durch die Kontaktphase zu evaluieren, wurde ein Generierungsassay unter Einsatz eines aPTT-Reagenzes durchgeführt. Im

Gegensatz zu einer hohen Menge an generiertem FXIa in NPP, kam es in FXII-Mangelplasma zu keiner FXIa-Generierung.

Diese Kontrollexperimente zeigen, dass in den jeweiligen Versuchsansätzen selektiv FXIa über den Thrombinweg oder über die Kontaktaktivierung generiert werden konnte.

Anhand der Generierungskurven, in denen der zeitliche Verlauf der gebildeten FXIa-Konzentration nach Aktivierung dargestellt wird, konnte eine 50-fach größere Menge an generiertem FXIa nach Kontaktaktivierung im Vergleich zur thrombininduzierten Aktivierung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Mengendifferenz ist die kontinuierliche und länger anhaltende FXIa-Bildung im Rahmen der Kontaktaktivierung durch das aPTT-Reagenz, während exogen zu Plasma zugegebenes Thrombin schnell durch endogene Inhibitoren eliminiert wird (Rühl et al., 2012). In vivo könnten durch eine anhaltende Thrombinbildung am Ort einer Gefäßverletzung potenziell deutliche höhere FXIa-Spiegel erreicht werden. Hinzu kommt, dass in vivo möglicherweise weitere Faktoren vorliegen, die eine thrombinabhängige Aktivierung von FXI begünstigen. Denkbar ist, dass von aktivierten Thrombozyten sezernierte Polyphosphate lokal erheblich höhere Konzentrationen erreichen und als potenzieller Kofaktor eine stärkere FXIa-Generierung verursachen, als Dextransulfat in den In-vitro-Experimenten. Alternativ könnten auch aus geschädigtem Gewebe freigesetzte, negativ geladene DNA oder andere, bislang unbekannte Moleküle in vivo als effizientere Kofaktoren dienen.

4.3 Unterschiede in der Aktivierungsdynamik von FXI in vivo in zwei verschiedenen klinischen Szenarien

Die Hypothese, dass in vivo gebildetes Thrombin zu einer FXI-Aktivierung führt, sollte in zwei klinischen Szenarien getestet werden, in denen auf verschiedene Art und Weise eine Gerinnungsaktivierung ausgelöst wurde.

In der SHAPE-Kohorte wurde durch die intravenöse Applikation von 15 µg/kg rFVIIa eine systemische Gerinnungsaktivierung über den extrinsischen Signalweg induziert. In vorab in vitro mittels CAT durchgeführten Thrombingenerierungsversuchen konnten ausreichende Mengen an Thrombin gebildet werden, um ebenfalls in vitro in Anwesenheit eines Kofaktors messbare FXIa-Konzentrationen zu generieren, wenn die durch diese rFVIIa-Dosierung in früheren Studien von Rühl et al. (2018, 2019) erzielte rFVIIa-Plasmakonzentration von 250 ng/ml eingesetzt wurde.

In vivo konnte nach der rFVIIa-Gabe eine systemische Thrombingenerierung durch den Plasmakonzentrationsanstieg der indirekten Thrombinbildungsmarker F1+2 und TAT nachgewiesen werden. Allerdings blieb das mittels OECA gemessene freie Thrombin unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die rasche Inaktivierung des gebildeten freien Thrombins, wobei die Komplexbildung mit AT im Vordergrund steht und zu erhöhten TAT-Spiegeln führt. Mit 44 Minuten haben TAT-Komplexe eine deutlich längere Halbwertszeit im Plasma als freies Thrombin (ca. 1 Minute), sodass diese kumulieren und dadurch leichter nachzuweisen sind. Auch der Thrombinbildungsmarker F1+2 hat mit ungefähr 120 Minuten eine deutlich längere Halbwertszeit als freies Thrombin, sodass höhere Plasmaspiegel erreicht werden (Rühl et al., 2012; Rühl et al., 2015).

Die Plasmakonzentration von FXIa blieb im gesamten Beobachtungszeitraum von 8 Stunden nach der intravenösen rFVIIa-Gabe unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze. Selbst bei den Probanden mit einer VTE in der Vorgeschichte, bei denen sich im Vergleich zu den Probanden mit blander Vorgeschichte ein signifikant höherer Anstieg der Thrombinbildungsmarker zeigte, konnten keine messbaren FXIa-Konzentrationen beobachtet werden. Es liegt nahe, dass die höhere Thrombinbildungsrate in dieser Kohorte unabhängig von einer FXI-Aktivierung und somit unabhängig von einem FXI-abhängigen Feedback-Mechanismus zur Thrombinamplifizierung war, obwohl erhöhte FXI-Spiegel bekanntermaßen mit einem erhöhten Risiko für eine pathologische Thrombusbildung einhergehen (Meijers et al., 2000; Yang et al., 2006).

In der OP-Kohorte kam es zu einer systemischen Gerinnungsaktivierung durch ein lokales chirurgisches Trauma. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der medianen FXIa-Plasmakonzentration von dem Ausgangswert 3,69 pmol/l auf 9,41 pmol/l zur OP-Halbzeit und 10,13 pmol/l zum OP-Ende. Sowohl der Ausgangswert als auch die medianen Spitzenspiegel sind vergleichbar mit den Ergebnissen aus vorherigen Studien. Dort wurde bereits eine mediane FXIa-Ausgangskonzentration von 2,7 pmol/l bei gesunden Probanden mittels eines auf der In-vitro-Thrombingenerierung basierenden FXIa-Assays gemessen (Loeffen et al., 2014). In einer Studie an Patienten mit Verletzungen unterschiedlichen Schweregrades ohne Schock wurden posttraumatisch mediane FXIa-Konzentrationen von 5,7 bis 6,8 pmol/l gemessen (Prior et al., 2017). Bei penetrierendem

Trauma lagen die medianen FXIa-Konzentrationen sogar bei 10,6 pmol/l (Prior et al., 2019). Da in diesen Studien methodisch bedingt keine dynamische Analyse der FXI-Aktivierung möglich war, liegen die dort gemessenen FXIa-Konzentrationen mutmaßlich unterhalb des Maximums.

Neben den zur OP-Halbzeit und zum OP-Ende erhöhten FXIa-Konzentrationen zeigte sich zu diesen Zeitpunkten auch ein signifikanter Konzentrationsanstieg von freiem Thrombin und den indirekten Thrombinbildungsmarkern F1+2 und TAT (Friedrich et al., 2018). Dabei konnte eine hohe Korrelation zwischen den FXIa-Spiegeln und den Plasmaspiegeln von freiem Thrombin, F1+2 und TAT zur OP-Halbzeit festgestellt werden, sodass von einem Zusammenhang zwischen der Thrombin- und FXIa-Bildungsrate sowie deren gegenseitiger Verstärkung in vivo auszugehen ist.

Es ist nicht vollständig auszuschließen, dass das unterschiedliche Ausmaß der FXIa-Bildung in vivo durch Unterschiede zwischen den Populationen der SHAPE- und der OP-Kohorte miterklärt werden kann. In der OP-Kohorte waren das durchschnittliche Patientenalter und der durchschnittliche BMI höher als in der SHAPE-Kohorte. Außerdem waren unter den operativ versorgten Patienten mehr Männer (60 %), während sich unter den Probanden in der SHAPE-Studie mehr Frauen (65,8 %) befanden. Diese Eigenschaften lassen ein höheres basales Niveau der Gerinnungsaktivität in der OP-Kohorte vermuten, welches sich auch im präoperativen FXIa-Ausgangswert von 3,69 pmol/l gegenüber dem FXIa-Ausgangswert unterhalb der Bestimmungsgrenze ($< 3,48$ pmol/l) in der SHAPE-Kohorte widerspiegelt. Dass die Korrelation zwischen der Thrombin- und FXIa-Bildung in der OP-Kohorte im Gegensatz zur völlig ausbleibenden FXI-Aktivierung in der SHAPE-Kohorte allein durch diese Unterschiede der Studienteilnehmer zu erklären ist, ist jedoch unwahrscheinlich.

Eine plausiblere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in der SHAPE- und der OP-Studie könnte die Tatsache sein, dass es bei einem lokalen chirurgischen Trauma zu einer Gefäßverletzung und in der Folge zu einer physiologischen Gerinnungsaktivierung kommt. Hierbei wird nicht nur die plasmatische Gerinnung, sondern auch die Thrombozytenaggregation initiiert. Sowohl die negativ geladenen Polyphosphate, die in den Granula der Thrombozyten gespeichert sind und bei deren Aktivierung sezerniert werden, als auch durch verletztes Gewebe exponierter TF oder freigelegte negativ

geladene DNA- und RNA-Bruchstücke könnten als Kofaktor bei der thrombinabhängigen Aktivierung von FXI dienen (Choi et al., 2011; Grover und Mackman, 2018; Ivanov et al., 2017). All diese Einflussfaktoren fehlten in der SHAPE-Kohorte, in der es lediglich zu einer extrinsischen Gerinnungsaktivierung ohne Trauma kam. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es wie bereits in den in vitro durchgeführten FXIa-Generierungsexperimenten auch in vivo eines Kofaktors für die thrombinabhängige FXI-Aktivierung bedarf, welcher nicht frei im Blut zirkuliert.

Neben der Kofaktorabhängigkeit gibt es weitere Erklärungsansätze für die höheren FXIa-Konzentrationen in der OP-Kohorte als in der SHAPE-Kohorte. Am Ort des chirurgischen Traumas könnte die lokale Thrombinkonzentration deutlich höher sein als die systemische Thrombinkonzentration nach intravenöser rFVIIa-Gabe. Denkbar ist, dass dadurch lokal eine Schwelle überschritten wird, sodass messbare Mengen FXIa generiert werden. Diese Hypothese wird durch die im Vergleich höheren Spiegel an freiem Thrombin und TAT in der OP-Kohorte unterstützt.

Alternativ ist es auch möglich, dass es weitere, bislang unbekannte Proteasen gibt, die am Ort einer Verletzung die FXI-Aktivierung induzieren oder die FXIa-Elimination durch Inhibitoren regulieren.

4.4 FXIa als prognostischer Biomarker und Ziel antikoagulatorischer Medikamente

Es ist bekannt, dass FXIa eine wichtige Rolle in der Verstärkung der Thrombingenerierung und somit der Aufrechterhaltung einer Gerinnungsaktivierung spielt. Gegenregulatorisch wird der Plasmaspiegel von FXIa durch eine Vielzahl von SERPINen inhibiert. Hierzu zählen unter anderem AT, C1-Inhibitor, Protease Nexin 1 und der Protein-Z-abhängige Proteaseinhibitor. Dadurch ist die Halbwertszeit von FXIa im Kreislauf auf ungefähr 2,5 Stunden begrenzt (Emsley et al., 2010; Loeffen et al., 2014). Trotz dieser starken inhibitorischen Gegenregulation konnten bei den Patienten in der OP-Kohorte auch 24 Stunden nach der Operation noch erhöhte mediane FXIa-Spiegel von 9,38 pmol/l im Plasma festgestellt werden. Dies weist auf eine anhaltende FXIa-Bildung auch nach dem Verschluss der verletzten Gefäßwand hin. Die anhaltend erhöhten FXIa-Spiegel könnten zu einem posttraumatischen Hyperkoagulationszustand und somit zum postoperativen Thromboserisiko beitragen.

Die in der OP-Kohorte untersuchten Patienten erhielten postoperativ alle 40 mg Enoxaparin. Hierunter kam es in dieser Kohorte zu keinem thromboembolischen Ereignis. Insbesondere posttraumatisch besteht allerdings bei dem Einsatz der zur medikamentösen Thromboseprophylaxe verfügbaren Antikoagulanzen, welche letztlich die zwei Schlüsselfaktoren Thrombin und/oder FXa inhibieren, ein erhöhtes Blutungsrisiko. Als alternative postoperative Antikoagulanzen befinden sich mehrere Medikamente, die FXI oder FXIa auf unterschiedliche Art und Weise inhibieren, in der klinischen Entwicklung, da man sich durch sie eine effektive Antikoagulation bei gleichzeitig nur geringem Blutungsrisiko verspricht. Eine Zulassung für diese Medikamente gibt es bislang nicht (Al-Horani und Desai, 2016; Székely et al., 2019).

Zwei FXI-inhibierende Medikamente zur Senkung des postoperativen Thromboserisikos befinden sich in klinischen Phase-II-Studien. Die Wirksamkeit eines FXI-ASO (ISIS 416858), welches die FXI-Synthese in der Leber durch die spezifische Bindung an mRNA reduziert, wurde in diesen Studien mit der Wirksamkeit des üblicherweise eingesetzten niedermolekularen Heparins Enoxaparin zur Prävention postoperativer venöser Thrombosen nach elektiver Implantation einer Knieendoprothese bei 300 Patienten verglichen. Dabei zeigte die subkutane Verabreichung von 200 mg FXI-ASO prä- und postoperativ eine vergleichbare Wirksamkeit wie 40 mg Enoxaparin postoperativ. Eine höhere Dosierung von 300 mg FXI-ASO war 40 mg Enoxaparin sogar überlegen. Blutungen traten unter der Gabe des FXI-ASO (3 %) seltener auf als unter Enoxaparin (8 %) (Büller et al., 2015).

Ein zweites, in einer klinischen Phase-II-Studie befindliches Medikament ist der monoklonale Antikörper Osocimab, welcher spezifisch an FXIa bindet und dessen Aktivität hemmt. In einer Studie mit 813 Patienten zeigte die postoperative Gabe von Osocimab eine vergleichbare Wirksamkeit wie Enoxaparin zur Prävention postoperativer Thrombosen nach Implantation einer Knieendoprothese. Die präoperative subkutane Verabreichung von Osocimab war der postoperativen Gabe von Enoxaparin bezüglich der Wirksamkeit überlegen (Weitz et al., 2020). Diese vielversprechenden Ergebnisse rechtfertigen weitere klinische Studien zur Testung der Wirksamkeit und Verträglichkeit FXI/FXIa-inhibierender Medikamente.

Die Wirksamkeit dieser Medikamente unterstreicht die zentrale Rolle des FXI während der Thrombogenese. Gemäß den Ergebnissen aus der in dieser Arbeit beschriebenen OP-Studie könnte der postoperativ mittels ECA gemessene FXIa-Plasmaspiegel in Zukunft eventuell als prognostischer Biomarker zur Einschätzung des individuellen Thromboserisikos dienen. Um die Aussagekraft dieses Biomarkers zu verifizieren, sind jedoch weitere klinische Studien nötig.

Der SHAPE-Ansatz erwies sich leider nicht als geeignet, um das individuelle Thromboserisiko gegebenenfalls schon vor einer geplanten Operation anhand der Messung des FXIa-Spiegels zu prognostizieren. Sogar bei Probanden mit bekannter Thrombophilie konnte nach der intravenösen Gabe von rFVIIa keine Aktivierung von FXI in vivo beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bei den Probanden mit einer VTE in der Vorgeschichte ein signifikant höherer Anstieg der indirekten Thrombinbildungsmarker als in der Kohorte gesunder Probanden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer vorherigen Studie, bei der mit Hilfe des SHAPE-Ansatzes erhöhte Thrombinbildungsmarker bei FVL-Trägern festgestellt wurden (Rühl et al., 2018). Entsprechend diesen Erkenntnissen erscheint die Messung der indirekten Thrombinbildungsmarker als prognostische Biomarker zur Einschätzung des Thromboserisikos mittels SHAPE-Methode vielversprechend.

5. Zusammenfassung

Der Gerinnungsfaktor XI (FXI) kann sowohl im Rahmen der Kontaktaktivierung durch den aktiven Gerinnungsfaktor XII als auch extrinsisch durch Thrombin aktiviert werden. Man nimmt an, dass die Aktivierung von FXI durch Thrombin den physiologisch relevanten Weg darstellt, da ein Faktor-XII-Mangel nicht mit einer Blutungsneigung einhergeht. In vitro ist die Anwesenheit anionischer Polymere als Kofaktoren für die thrombininduzierte FXI-Aktivierung erforderlich. Um die Aktivierungsmechanismen von FXI genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Enzyme Capture Assay (ECA) entwickelt, der basierend auf einem monoklonalen Antikörper eine sensitive Quantifizierung von aktiviertem FXI (FXIa) ermöglicht. In der Endkonfiguration ermöglichte der ECA die FXIa-Messung in Plasma mit einer Nachweisgrenze von 0,932 pmol/l und einer unteren Bestimmungsgrenze von 3,481 pmol/l. In In-vitro-Experimenten konnte die Eignung des FXIa-ECA zur Bestimmung des in Plasma gebildeten FXIa belegt werden. Bei einem 1:5-Verhältnis des Kontaktaktivators Actin® FS zu Plasma wurde eine FXIa-Spitzenkonzentration von 17,09 nmol/l erreicht. Durch Thrombin mit Dextransulfat als Kofaktor konnte selbst bei unphysiologisch hohen Thrombinkonzentrationen nur erheblich weniger FXIa generiert werden (z. B. eine FXIa-Konzentration von 0,32 nmol/l bei 5 µg/ml Thrombin). Schließlich wurde die Rolle von Thrombin bei der FXIa-Bildung in vivo untersucht. Dazu wurde die zeitabhängige Thrombin- und FXIa-Bildung nach einer Gerinnungsaktivierung durch die intravenöse Injektion von 15 µg/kg rekombinantem aktiviertem Gerinnungsfaktor VIIa (rFVIIa) in einer Kohorte von 79 Probanden untersucht. Eine weitere Kohorte bestand aus 35 Patienten, bei denen die Thrombin- und FXIa-Bildung im Verlauf von elektiven orthopädischen Operationen gemessen wurde. In dieser OP-Kohorte zeigte sich ein Thrombinanstieg von < 1,06 pmol/l vor OP auf 9,96 pmol/l während der OP (P = 0,001). Der Thrombinanstieg wurde begleitet von einem FXIa-Anstieg von 3,69 pmol/l auf 9,41 pmol/l (P = 0,001). Demgegenüber war in der rFVIIa-Kohorte kein Anstieg von freiem Thrombin und FXIa zu verzeichnen. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass das OP-Trauma zu einer thrombinabhängigen FXI-Aktivierung führte, wohingegen die niedrigdosierte rFVIIa-Gabe zu keiner messbaren FXIa-Antwort führte. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer vermehrten FXIa-Bildung nach rFVIIa-Injektion könnte das Fehlen erforderlicher Kofaktoren sein, die im OP-Szenario im Wundgebiet vorhanden sind.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über den intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweg der sekundären Hämostase.....	13
Abb. 2: Fibrinolytisches System mit aktivierenden und inhibierenden Prozessen.....	18
Abb. 3: Die Rolle des FXI als positiver Verstärker der Thrombingenerierung.....	20
Abb. 4: Die molekulare Struktur eines FXI-Monomers.....	22
Abb. 5: Verschiedene Varianten des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)....	46
Abb. 6: Beispiel einer mittels Calibrated Automated Thrombogram (CAT) erstellten In-vitro-Thrombingenerierungskurve	49
Abb. 7: Ermittlung der optimalen Konzentration des Capture-Antikörpers.....	61
Abb. 8: Einfluss verschiedener Benzamidinkonzentrationen auf die amidolytische Aktivität von FXIa.....	62
Abb. 9: Einfluss des Zymogens FXI auf die FXIa-Messung mittels ECA.....	63
Abb. 10: Messergebnisse im FXIa-ECA in Abhängigkeit von der Verdünnung.....	64
Abb. 11: Einfluss der Lagerungsbedingungen und der Verdünnung auf die FXIa-Stabilität.....	66
Abb. 12: Thrombininduzierte FXI-Aktivierung in Abhängigkeit von der Dextransulfatkonzentration	67
Abb. 13: Western-Blot-Analyse verschiedener Reaktionsansätze mit FXI, Thrombin und Dextransulfat	68
Abb. 14: Repräsentative FXIa-Generierungskurve nach Kontaktaktivierung in normalem Poolplasma (NPP)	70
Abb. 15: Kontrollexperimente zum Ausschluss einer Beteiligung des Kontaktsystems während der FXI-Aktivierung durch Thrombin und den Kofaktor Dextransulfat.....	71
Abb. 16: Repräsentative FXIa-Generierungskurve nach Aktivierung durch Thrombin und Dextransulfat in normalem Poolplasma (NPP)	72
Abb. 17: Morphologie der FXIa-Generierungskurven im Vergleich zwischen normalem Poolplasma (NPP) und FXI-Mangelplasma	74
Abb. 18: Korrelation zwischen der generierten FXIa-Menge und der FXI-Restaktivität im Plasma von Hämophilie-C-Patienten.....	75
Abb. 19: In-vitro-Thrombingenerierung durch rFVIIa.....	77

Abb. 20: Pharmakokinetisches Profil von rFVIIa.....	79
Abb. 21: rFVIIa-induzierte Veränderung verschiedener Biomarker der Hämostase in vivo	81
Abb. 22: Anstieg verschiedener Biomarker der Hämostase in vivo während orthopädischer Operationen.....	85
Abb. 23: Anstieg der FXIa-Konzentration in vivo während orthopädischer Operationen.	87
Abb. 24: Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von FXIa und weiteren Biomarkern der Hämostase zur OP-Halbzeit.....	89

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Reproduzierbarkeit des FXIa-ECA.....	69
Tab. 2: Patienten mit angeborenem FXI-Mangel.....	73
Tab. 3: Probandenmerkmale in der SHAPE-Kohorte.....	78
Tab. 4: Demographische und klinische Daten der OP-Kohorte mit größerem und kleinerem operativem Eingriff.....	83
Tab. 5: Vergleich der Konzentrationsanstiege verschiedener Biomarker nach Gerinnungsaktivierung in vivo.....	90

8. Literaturverzeichnis

Al-Horani RA, Desai UR. Factor Xla inhibitors: A review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 2016; 26: 323–345

Amiral J, Dunois C, Amiral C, Seghatchian J. The various assays for measuring activity states of factor VIIa in plasma and therapeutic products: Diagnostic value and analytical usefulness in various pathophysiological states. *Transfus Apher Sci* 2017; 56: 91–97

Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72: 4–15

Baglia FA, Badellino KO, Li CQ, Lopez JA, Walsh PN. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem* 2002; 277: 1662–1668

Baglia FA, Walsh PN. A binding site for thrombin in the apple 1 domain of factor XI. *J Biol Chem* 1996; 271: 3652–3658

Bane CE, Ivanov I, Matafonov A, Boyd KL, Cheng Q, Sherwood ER, Tucker EI, Smiley ST, McCarty OJT, Gruber A, Gailani D. Factor XI Deficiency Alters the Cytokine Response and Activation of Contact Proteases during Polymicrobial Sepsis in Mice. *PloS one* 2016; 11: e0152968

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Ronde H de, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–67

Bickmann JK, Baglin T, Meijers JCM, Renné T. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. *Curr Opin Hematol* 2017; 24: 419–426

Bolton-Maggs PH. Factor XI deficiency and its management. *Haemophilia* 2000; 6 Suppl 1: 100–109

Borne PA von dem, Cox LMP, Bouma BN. Factor XI enhances fibrin generation and inhibits fibrinolysis in a coagulation model initiated by surface-coated tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 251–257

Borne PA von dem, Meijers JC, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 1995; 86: 3035–3042

Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 103–112

Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, Segers A, Verhamme P, Weitz JI. Factor XI Antisense Oligonucleotide for Prevention of Venous Thrombosis. *N Engl J Med* 2015; 372: 232–240

Bundesärztekammer, 2020: Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Querschnitts-Leitlinien_BAEK_zur_Therapie_mit_Blutkomponenten_und_Plasmaderivaten-Gesamtnovelle_2020.pdf (Zugriffsdatum: 23.09.2021)

Butenas S, Undas A, Gissel MT, Szuldrzynski K, Zmudka K, Mann KG. Factor XIa and tissue factor activity in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2008; 99: 142–149

Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res* 2011; 127: S21–S25

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev* 2015; 29: 17–24

Cheng Q, Kantz J, Poffenberger G, Powers AC, Gailani D. Factor XI protein in human pancreas and kidney. *Thromb Haemost* 2008; 100: 158–160

Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, Sisler I, Matafonov A, Sun M-F, White-Adams TC, Smith SA, Hanson SR, McCarty OJT, Renné T, Gruber A, Gailani D. A role for factor XIIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 2010; 116: 3981–3989

Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood* 2011; 118: 6963–6970

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363–10370

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310–1312

Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, Wygrecka M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cell Signal* 2018; 51: 257–265

Eilertsen K-E, Østerud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 521–538

Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood* 2010; 115: 2569–2577

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871–874

Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003; 124: 26S–32S

Fleisher LA, Fleischmann KE, Auerbach AD, Barnason SA, Beckman JA, Bozkurt B, Davila-Roman VG, Gerhard-Herman MD, Holly TA, Kane GC, Marine JE, Nelson MT,

Spencer CC, Thompson A, Ting HH, Uretsky BF, Wijeyesundera DN. 2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. Developed in collaboration with the American College of Surgeons, American Society of Anesthesiologists, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Vascular Medicine Endorsed by the Society of Hospital Medicine. *J Nucl Cardiol* 2015; 22: 162–215

Fouw NJ de, van Hinsbergh VW, Jong YF de, Haverkate F, Bertina RM. The interaction of activated protein C and thrombin with the plasminogen activator inhibitor released from human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1987; 57: 176–182

Franchini M, Manzato F, Salvagno GL, Montagnana M, Lippi G. The use of desmopressin in congenital factor XI deficiency: a systematic review. *Ann Hematol* 2009; 88: 931–935

Fredenburgh JC, Weitz JI. Overview of Hemostasis and Thrombosis. In: Hoffman R, Benz EJ Jr., Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama ME, Abutalib SA, Hrsg. *Hematology*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018: 1831–1842

Fricke DR, Chatterjee S, Majumder R. Protein S in preventing thrombosis. *Aging (Albany NY)* 2019; 11: 847–848

Friedrich MJ, Schmolders J, Rommelspacher Y, Strauss A, Rühl H, Mayer G, Oldenburg J, Wirtz DC, Müller J, Pötzsch B. Activity Pattern Analysis Indicates Increased but Balanced Systemic Coagulation Activity in Response to Surgical Trauma. *TH Open* 2018; 2: e350-e356

Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909–912

Gailani D, Broze GJ. Effects of glycosaminoglycans on factor XI activation by thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 15–20

Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011; 39: 273–280

Geiger M. Komponenten des fibrinolytischen Systems. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 269–278

Geng Y, Verhamme IM, Smith SB, Sun M-F, Matafonov A, Cheng Q, Smith SA, Morrissey JH, Gailani D. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation. *Blood* 2013; 121: 3962–3969

Green L, Lawrie AS, Patel S, Hossain F, Chitolie A, Mackie IJ, Haddad FS, Machin SJ. The impact of elective knee/hip replacement surgery and thromboprophylaxis with rivaroxaban or dalteparin on thrombin generation. *Br J Haematol* 2010; 151: 469–476

Grover SP, Mackman N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018: 709–725

Han X, Fiehler R, Broze GJ. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049–3055

Hao C, Xu H, Yu L, Zhang L. Heparin: An essential drug for modern medicine. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2019; 163: 1–19

Hardisty RM, Margolis J. The role of Hageman factor in the initiation of blood coagulation. *Br J Haematol* 1959; 5: 203–211

Hemker H, Al Dieri R, Smedt E de, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic/thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553–561

Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, Smed E de, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 249–253

Hiller E. Basic Principles of Hemostasis. In: Munker R, Hiller E, Glass J, Paquette R, Hrsg. *Modern Hematology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007: 327–345

Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 199–205

Ivanov I, Shakhawat R, Sun M-F, Dickeson SK, Puy C, McCarty OJT, Gruber A, Matafonov A, Gailani D. Nucleic acids as cofactors for factor XI and prekallikrein activation: Different roles for high-molecular-weight kininogen. *Thromb Haemost* 2017; 117: 671–681

Jain S, Pitoc GA, Holl EK, Zhang Y, Borst L, Leong KW, Lee J, Sullenger BA. Nucleic acid scavengers inhibit thrombosis without increasing bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 12938–12943

James P, Salomon O, Mikovic D, Peyvandi F. Rare bleeding disorders - bleeding assessment tools, laboratory aspects and phenotype and therapy of FXI deficiency. *Haemophilia* 2014; 20 Suppl 4: 71–75

Jesty J, Spencer AK, Nemerson Y. The mechanism of activation of factor X. Kinetic control of alternative pathways leading to the formation of activated factor X. *J Biol Chem* 1974; 249: 5614–5622

Joe D, 2007: Coagulation. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation_full.svg (Zugriffsdatum: 23.09.2021)

Key NS. Epidemiologic and clinical data linking factors XI and XII to thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014: 66–70

Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer H-U, Burfeind P, Renné C, Gailani D, Nieswandt B, Renné T. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 2006; 203: 513–518

Knauer DJ, Majumdar D, Fong PC, Knauer MF. SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *J Biol Chem* 2000; 275: 37340–37346

Kravtsov DV, Wu W, Meijers JCM, Sun M-F, Blinder MA, Dang TP, Wang H, Gailani D. Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain. *Blood* 2004; 104: 128–134

Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 1953; 41: 637–647

Loeffen R, van Oerle R, Groot PG de, Waltenberger J, Crijns HJ, Spronk HMH, Cate H ten. Increased factor XIa levels in patients with a first acute myocardial infarction: the introduction of a new thrombin generation based factor XIa assay. *Thromb Res* 2014; 134: 1328–1334

Loeffen R, van Oerle R, Leers MPG, Kragten JA, Crijns H, Spronk HMH, Cate H ten. Factor XIa and Thrombin Generation Are Elevated in Patients with Acute Coronary Syndrome and Predict Recurrent Cardiovascular Events. *PloS One* 2016; 11: e0158355

Lorentz CU, Verboort NG, Wallisch M, Hagen MW, Shatzel JJ, Olson SR, Puy C, Hinds MT, McCarty OJT, Gailani D, Gruber A, Tucker EI. Contact Activation Inhibitor and Factor XI Antibody, AB023, Produces Safe, Dose-Dependent Anticoagulation in a Phase 1 First-In-Human Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39: 799–809

Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498–499

Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg* 2009; 108: 1447–1452

Mannhalter C. Faktor XI: Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999: 132–139

Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 9–14

Matafonov A, Cheng Q, Geng Y, Verhamme IM, Umunakwe O, Tucker EI, Sun M-F, Serebrov V, Gruber A, Gailani D. Evidence for factor IX-independent roles for factor XIa in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2118–2127

Matafonov A, Leung PY, Gailani AE, Grach SL, Puy C, Cheng Q, Sun M-F, McCarty OJT, Tucker EI, Kataoka H, Renné T, Morrissey JH, Gruber A, Gailani D. Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood* 2014; 123: 1739–1746

Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696–701

Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun M-F, Cheng Q, Dickeson SK, Li C, Sun D, Verhamme IM, Emsley J, Gailani D. An update on factor XI structure and function. *Thromb Res* 2018; 161: 94–105

Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1097–1105

Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993; 81: 734–744

Müller J, Becher T, Braunstein J, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50: 6075–6078

Mussbacher M, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrottmaier WC, Assinger A. Mechanisms of Hemostasis: Contributions of Platelets, Coagulation Factors, and the Vessel Wall. In: Geiger M, Hrsg. *Fundamentals of Vascular Biology*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2019: 145–169

Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266: 7353–7358

Nakamura K, Toyohira H, Kariyazono H, Yamada K, Moriyama Y, Taira A. Relationship between changes in F1+2 and TAT levels and blood coagulation early after prosthetic valve replacement. *Thromb Res* 1997; 86: 161–171

Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43: 814–826

Navaneetham D, Jin L, Pandey P, Strickler JE, Babine RE, Abdel-Meguid SS, Walsh PN. Structural and mutational analyses of the molecular interactions between the catalytic domain of factor XIa and the Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2. *J Biol Chem* 2005; 280: 36165–36175

Pathak M, Wilmann P, Awford J, Li C, Hamad BK, Fischer PM, Dreveny I, Dekker LV, Emsley J. Coagulation factor XII protease domain crystal structure. *J Thromb Haemost* 2015: 580–591

Perera V, Wang Z, Luetzgen J, Wang J, Li D, Desouza M, Cerra M, Seiffert D. First-in-human study to assess the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of BMS-986177/JNJ-70033093, a direct, reversible, small molecule Factor XIa inhibitor in healthy volunteers. *Eur Heart J* 2020; 41

Petrides PE. Fibrinolyse. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007: 987–988

Pike GN, Cumming AM, Hay CRM, Bolton-Maggs PHB, Burthem J. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood* 2015; 126: 397–405

Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997; 15: 398–408

Pötzsch B, Madlener K. Globaltests und Einzelfaktoren. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 861–866

Prior SM, Cohen MJ, Conroy AS, Nelson MF, Kornblith LZ, Howard BM, Butenas S. Correlation between factor (F)XIa, FIXa and tissue factor and trauma severity. *J Trauma Acute Care Surg* 2017; 82: 1073–1079

Prior SM, Park MS, Mann KG, Butenas S. Endogenous Procoagulant Activity in Trauma Patients and Its Relationship to Trauma Severity. *TH Open* 2019; 3: e10–e19

Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961; 36: 212–219

Puy C, Rigg RA, McCarty OJT. The hemostatic role of factor XI. *Thromb Res* 2016a; 141 Suppl 2: S8–S11

Puy C, Tucker EI, Ivanov IS, Gailani D, Smith SA, Morrissey JH, Gruber A, McCarty OJT. Platelet-Derived Short-Chain Polyphosphates Enhance the Inactivation of Tissue Factor Pathway Inhibitor by Activated Coagulation Factor XI. *PLoS One* 2016b; 11: e0165172

Puy C, Tucker EI, Matafonov A, Cheng Q, Zientek KD, Gailani D, Gruber A, McCarty OJT. Activated factor XI increases the procoagulant activity of the extrinsic pathway by inactivating tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 2015; 125: 1488–1496

Ragni MV, Sinha D, Seaman F, Lewis JH, Spero JA, Walsh PN. Comparison of bleeding tendency, factor XI coagulant activity, and factor XI antigen in 25 factor XI-deficient kindreds. *Blood* 1985; 65: 719–724

Rassow J. Reaktionen auf Verletzungen: Blutstillung und Blutgerinnung. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme, 2008: 736–755

Ratnoff OD, Margolius A. Hageman trait: an asymptomatic disorder of blood coagulation. *Trans Assoc Am Physicians* 1955; 68: 149–154

Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 82: 171–174

Rosing J, Maurissen LFA, Tchaikovski SN, Tans G, Hackeng TM. Protein S is a cofactor for tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 2008; 122 Suppl 1: S60-3

Rühl H, Berens C, Winterhagen A, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Label-Free Kinetic Studies of Hemostasis-Related Biomarkers Including D-Dimer Using Autologous Serum Transfusion. *PLoS One* 2015; 10: e0145012

Rühl H, Berens C, Winterhagen FI, Reda S, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Increased Activated Protein C Response Rates Reduce the Thrombotic Risk of Factor V Leiden Carriers But Not of Prothrombin 20210GA Carriers. *Circ Res* 2019; 125: 523–534

Rühl H, Friemann AM, Reda S, Schwarz N, Winterhagen FI, Berens C, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. Activated Factor XI is Increased in Plasma in Response to Surgical Trauma but not to Recombinant Activated FVII-Induced Thrombin Formation. *J Atheroscler Thromb* 2022; 29: 82–98

Rühl H, Müller J, Harbrecht U, Fimmers R, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Thrombin inhibition profiles in healthy individuals and thrombophilic patients. *Thromb Haemost* 2012: 848–853

Rühl H, Winterhagen FI, Berens C, Müller J, Oldenburg J, Pötzsch B. In vivo thrombin generation and subsequent APC formation are increased in factor V Leiden carriers. *Blood* 2018; 131: 1489–1492

Salazar A, Velázquez-Soto H, Ayala-Balboa J, Jiménez-Martínez MC. Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches. In: Athari SS, Hrsg. *Allergen*. London: IntechOpen, 2017: 77–99

Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 2008; 111: 4113–4117

Salomon O, Steinberg DM, Zucker M, Varon D, Zivelin A, Seligsohn U. Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2011; 105: 269–273

Samuel M, Pixley RA, Villanueva MA, Colman RW, Villanueva GB. Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem* 1992; 267: 19691–19697

Sang Y, Roest M, Laat B de, Groot PG de, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev* 2021; 100733

Santoro C, Di Mauro R, Baldacci E, Angelis F de, Abbruzzese R, Barone F, Bochicchio RA, Ferrara G, Guarini A, Foà R, Mazzucconi MG. Bleeding phenotype and correlation with factor XI (FXI) activity in congenital FXI deficiency: results of a retrospective study from a single centre. *Haemophilia* 2015; 21: 496–501

Schmaier AH. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest* 2008; 118: 3006–3009

Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 28–39

Seligsohn U. Factor XI deficiency in humans. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 84–87

Siemens, 2013: Hämostase-Diagnostik von Siemens Healthcare Diagnostics. <https://www.henryschein.com/assets/Medical/1143494.pdf> (Zugriffsdatum: 23.09.2021)

Song K-M, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)* 2012; 12: 612–631

Soulier J-P, Prou-Wartelle O. New Data on Hageman Factor and Plasma Thromboplastin Antecedent: The Role of 'Contact' in the Initial Phase of Blood Coagulation. *Br J Haematol* 1960; 6: 88–102

Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res* 2010; 125: 210–215

Székely O, Borgi M, Lip GYH. Factor XI inhibition fulfilling the optimal expectations for ideal anticoagulation. *Expert Opin Emerg Drugs* 2019; 24: 55–61

Tans G, Rosing J, Griffin JH. Sulfatide-dependent autoactivation of human blood coagulation Factor XII (Hageman Factor). *J Biol Chem* 1983; 258: 8215–8222

Tarumi T, Kravtsov DV, Zhao M, Williams SM, Gailani D. Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: transcription factor hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF-4alpha) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI. *J Biol Chem* 2002; 277: 18510–18516

Thomas D, Thelen K, Kraff S, Schwers S, Schiffer S, Unger S, Yassen A, Boxnick S. BAY 1213790, a fully human IgG1 antibody targeting coagulation factor XIa: First evaluation of safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3: 242–253

Ueckermann C. Exkurs BCS[®]-XP-System. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Schäfer H, Hrsg. *LaborMedizin*. Stuttgart, New York: Schattauer Stuttgart New York, 2008: 494–496

Undas A, Slowik A, Gissel M, Mann KG, Butenas S. Active tissue factor and activated factor XI in patients with acute ischemic cerebrovascular events. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 123–129

Verhoef JJF, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, McCarty OJT, Schiffelers R, Heijnen HF, Hendrickx AP, Schellekens H, Fens MH, Maat S de, Renné T, Maas C. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood* 2017; 129: 1707–1717

Weitz JI, Bauersachs R, Becker B, Berkowitz SD, Freitas MCS, Lassen MR, Metzigg C, Raskob GE. Effect of Osocimab in Preventing Venous Thromboembolism Among Patients Undergoing Knee Arthroplasty: The FOXTROT Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020; 323: 130–139

Wheeler AP, Gailani D. Why factor XI deficiency is a clinical concern. *Expert Rev Hematol* 2016; 9: 629–637

White GC. The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2267–2270

Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med* 2017; 48: 295–313

Wu W, Sinha D, Shikov S, Yip CK, Walz T, Billings PC, Lear JD, Walsh PN. Factor XI homodimer structure is essential for normal proteolytic activation by factor XIIa, thrombin, and factor XIa. *J Biol Chem* 2008; 283: 18655–18664

Wuillemin WA, Hack CE, Bleeker WK, Biemond BJ, Levi M, Cate H ten. Inactivation of factor Xia in vivo: studies in chimpanzees and in humans. *Thromb Haemost* 1996a; 76: 549–555

Wuillemin WA, Mertens K, Cate H ten, Hack CE. Thrombin-mediated activation of endogenous factor XI in plasma in the presence of physiological glycosaminoglycans occurs only with high concentrations of thrombin. *Br J Haematol* 1996b; 92: 466–472

Yang DT, Flanders MM, Kim H, Rodgers GM. Elevated Factor XI Activity Levels Are Associated With an Increased Odds Ratio for Cerebrovascular Events. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 411–415

Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, López JA, Walsh PN, Leung LLK. Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* 2003: 48112–48119

Zantek ND, Hsu P, Meijer P, Smock KJ, Plumhoff EA, Refaai MA, van Cott EM. Quality of factor XI activity testing in North American Specialized Coagulation Laboratories. *Int J Lab Hematol* 2015; 37 Suppl 1: 99–107

Zhao M, Abdel-Razek T, Sun MF, Gailani D. Characterization of a heparin binding site on the heavy chain of factor XI. *J Biol Chem* 1998; 273: 31153–31159

Zucker M, Hauschner H, Seligsohn U, Rosenberg N. Platelet factor XI: intracellular localization and mRNA splicing following platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 2018; 69: 30–37

Zucker M, Seligsohn U, Salomon O, Wolberg AS. Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding risk in patients with severe factor XI deficiency. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1121–1130

9. Danksagung

Ich möchte allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch für die Überlassung des Themas und die hilfreichen Ratschläge während der Planung und Umsetzung.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Heiko Rühl für die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die motivierenden Worte und die moralische Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.