

Entwicklung und Anwendung verschiedener ELISA- Verfahren zum Nachweis von plasmatischem und thrombozytärem Gerinnungsfaktor V

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Agneta Seebold

Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. med Jörg Ellinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.11.2024

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

Widmung

In Liebe für meine Eltern und Großeltern
für eure grenzenlose Unterstützung und Liebe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Einführung.....	11
1.2	Physiologie der Hämostase	11
1.2.1	Primäre Hämostase.....	11
1.2.2	Sekundäre Hämostase	13
1.2.3	Fibrinolyse	15
1.3	Thrombomodulin-Protein-C-System.....	16
1.4	Faktor V	17
1.5	TFPI	23
1.6	Faktor V-short und TFPI.....	25
1.7	Faktor V Leiden / APC-Resistenz	26
1.8	Faktor V Mangel.....	27
1.9	Thrombozyten	28
1.10	Thrombozytärer Faktor V	33
1.11	Zielsetzung und Fragestellung.....	34
2	Materialien und Methoden.....	35
2.1	Materialien	35
2.1.1	Verwendete Chemikalien.....	35
2.1.2	Verwendete Pufferlösungen und Verdünnungsmedien	35

2.1.3	Verwendete Reagenzien	37
2.1.4	Verwendete Geräte und Materialien	37
2.2	Methoden	39
2.2.1	Herstellung von Thrombozyten-Lysaten	39
2.2.2	Antikörper Beschreibung und Bindungen	40
2.2.3	Aufreinigung der Antikörper	41
2.2.4	Biotinylierung der Antikörper	41
2.2.5	Überprüfung der Antikörperkonzentration nach Aufreinigung und Biotinylierung mittels NanoDrop	42
2.2.6	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) - Einleitung	42
2.2.7	Direkter ELISA	43
2.2.8	Indirekter ELISA	44
2.2.9	Sandwich-ELISA	44
2.2.10	Beschichten der ELISA-Platten	44
2.2.11	Bio-Layer Interferometrie	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Vorversuche zur Testetablierung	47
3.1.1	Testung der monoklonalen Antikörper im direkten ELISA und mit Biolayer-Interferometrie	47
3.1.2	Aufbau und Optimierung der in der Studie eingesetzten ELISA-Verfahren .	51
3.1.3	Charakterisierung der gewonnenen Plasmaproben und Thrombozytenlysate	

3.1.4	Faktor-V Aktivitätsbestimmung der Proben	55
3.1.5	Thrombozytenzahl der Lysate	56
3.1.6	Ergebnisse der FV-Bestimmungen in den Plasmaproben mittels der neu entwickelten ELISA-Verfahren	56
3.1.7	Ergebnisse der FV-Bestimmungen in den Thrombozytenlysaten mittels ELISA	57
3.2	Berechnung der Verteilung von Faktor V im gesamten Thrombozytenpool und im Blutplasma	58
3.3	Korrelation Thrombozytenzahl und Faktor V Aktivität in den Thrombozytenlysaten	60
3.4	Korrelation zwischen der plasmatischen und thrombozytären Faktor V-Aktivität	61
3.5	Korrelation der plasmatischen und thrombozytären Faktor V-Aktivität mit den mittels ELISA bestimmten FV-Konzentrationen.	62
4	Diskussion.....	68
4.1	Herstellung der Thrombozytenlysate	68
4.2	Verwendete Antikörper und ELISA-Tests.....	69
4.3	Vergleich mit bisheriger Forschung/Literatur.....	71
4.4	Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Messergebnisse der vier ELISA auf Basis der Bindungsfähigkeiten der Antikörper	73
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	77
5	Zusammenfassung.....	83
6	Abbildungsverzeichnis.....	85
7	Tabellenverzeichnis.....	87

8	Literaturverzeichnis	88
9	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS 13: A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13

ADP: Adenosindiphosphat

APC: Aktiviertes Protein C

ATP: Adenosintriphosphat

BSA: Bovines Serumalbumin

PBS: phosphate-buffered saline

COX-1: Cyclooxygenase-1

C4BP: Complement regulation C4b binding protein

DBPS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbant Assay

FFP: Fresh Frozen Plasma

FV: Faktor V

FVa: Faktor Va

GrPf: Grundpuffer

HRP: Horseradish peroxidase

MP: Faktor V Mangelplasma

OCS: Offenes kanalikuläres System

PA-I: Plasminogen-Activator-Inhibitor

RT: Raumtemperatur

SP: Humanes Standardplasma

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

T-PA: Tissue-type-plasminogen-activator

TRALI: Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz

TXA2: Thromboxan A2

VEGF: Vascular endothelial growth factor

vWF: Von-Willebrand-Faktor

GPIb/IX: Von-Willebrand-Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Einführung

Der Gerinnungsfaktor V (FV) ist ein Bestandteil der plasmatischen Gerinnungskaskade. Die Blutgerinnung ist eine wichtige Funktion des menschlichen Körpers, die bei einer Verletzung der Gefäßwand einen hohen Blutverlust verhindert, indem ein Gerinnsel (Thrombus) gebildet wird, welches die Läsion verschließt. Dieser Prozess beinhaltet sowohl zelluläre als auch plasmatische Komponenten, welche die Bildung und auch die nachfolgende Auflösung des Thrombus (Fibrinolyse) beeinflussen. Der Thrombus muss nach einer Verletzung schnell gebildet werden und zudem spezifisch auf das verletzte Gebiet begrenzt bleiben. Der gesamte Prozess mit allen beteiligten Komponenten, Regulationsmechanismen, Interaktionen und Abläufen wird als Hämostasesystem (Madlener und Pötzsch, 2010) bezeichnet. Der Ablauf des gesamten Prozesses kann grob unterteilt werden in die primäre und sekundäre Hämostase sowie die anschließende Fibrinolyse.

1.2 Physiologie der Hämostase

1.2.1 Primäre Hämostase

Das Ziel der primären Hämostase (Blutstillung) ist die Bildung eines Thrombus, welcher die Blutung stoppt und aus den Mechanismen der Thrombozytenadhäsion und -aggregation besteht. Die Thrombozyten, aus welchen der Thrombus besteht, sind durch ein Fibrinogennetz (Gawaz et al., 1991) verknüpft, welches jedoch zu Beginn der Bildung noch instabil ist, und erst mit der sekundären Hämostase verstärkt wird.

Neben den wesentlichen Mechanismen zum Verschluss der Gefäßläsion, bei welchen die Thrombozyten beteiligt sind, gibt es auch eine vaskuläre Komponente der Blutstillung. Nach einem Gefäßschaden erfolgt eine reflektorische Vasokonstriktion (Cheng et al., 2002; Steffel et al., 2006; Whittaker et al., 1976), die auf eine Reizung der glatten Muskulatur hin initiiert wird. Unterstützt wird die Konstriktion im weiteren Verlauf durch Thromboxan A₂, welches vom Thrombozyten ausgeschüttet wird (Jurk und Kehrel, 2008). Diese Gefäßverengung sorgt für eine Verkleinerung der Läsionsfläche und eine Strömungsumleitung, sodass der Blutverlust eingedämmt wird. Ein weiteres Resultat der Vasokonstriktion ist eine Erhöhung der Scherkräfte, wodurch die im Verhältnis zu den anderen Zellen

des Blutes kleinen Thrombozyten noch stärker nach außen gedrängt werden. Dies erleichtert zusätzlich deren Anlagerung an die Gefäßwand.

Die Hauptakteure der primären Hämostase sind die Thrombozyten, welche sich in einem ersten Schritt der Blutstillung an bei einer Verletzung freigelegte subendotheliale Strukturen anheften. Im physiologischen Zustand der Gefäßwand wird diese Adhäsion durch das intakte Endothel verhindert, welches die Gefäßwand auskleidet. Dies gewährleistet einen ungehinderten Blutfluss und verhindert eine Thrombenbildung. Zudem besitzt das Endothel inhibitorische Funktion über die Produktion von Prostacyclin, NO und CD39. Für die Adhäsion bei einem Endothelschaden sorgt der Von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieser wird von Endothelzellen gebildet und ins Blut sezerniert (Piovella et al., 1974). Liegt nach einer Verletzung das subendotheliale Kollagen frei, lagert sich vWF an das Kollagen an. Die Thrombozyten besitzen einen Von-Willebrand-Rezeptor (GPIb/IX) in Gestalt des GPIb-IX-V Komplexes (Schneppenheim und Budde, 2010), über welchen sie nun vWF binden können und so über diesen an der verletzten Gefäßwand anheften. (Schneppenheim und Budde, 2010). Eine weitere Wirkung des Rezeptors auf aktivierten Thrombozyten ist die Bereitstellung der Bindeseite für Alpha-Thrombin, wodurch die prokoagulatorischen Fähigkeiten des Thrombozyten verstärkt werden (Baglia et al., 2002). Nach der initialen Bindung an den Von-Willebrand-Rezeptor erfolgt die zusätzliche Bindung des Thrombozyten direkt an Kollagen über den GPVI-Rezeptor (Gremmel et al., 2016).

Durch die Adhäsion der Thrombozyten wird auch ihre Aktivierung ausgelöst. Dies bewirkt zum einen eine Veränderung ihrer äußeren Form. Im Ruhezustand liegen sie in Scheibenform vor, aktiviert bilden sie durch Phospholipidexpression an ihrer Membranoberfläche Zytoplasmaausläufer (Pseudopodien) aus (Reininger, 2010). Diese sorgen für eine bessere Interaktions- und Anlagerungsfähigkeit zu und an anderen Thrombozyten und der Gefäßwand. Auslöser für die Pseudopodienbildung sind die Bindung von vWF und die Aktivierung durch Thrombin. Zum anderen sorgt die Thrombozytenaktivierung für die Freisetzung von Substanzen aus den Thrombozyten selbst. Einer dieser Stoffe ist Adenosindiphosphat (ADP). Er bindet an den ADP-Rezeptor, welchen Thrombozyten an ihrer Ober-

fläche tragen, und aktiviert sie auf diesem Wege (Born, 1962). Es entsteht also eine positive Rückkopplung, durch welche weitere Thrombozyten rekrutiert und aktiviert werden. Thromboxan A₂ (TXA₂) stellt ein zweites Molekül dar, welches im Thrombozyten durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) synthetisiert und bei Aktivierung ausgeschüttet wird. Dessen Wirkungen sind zum einen ebenfalls eine Aktivierung von weiteren Thrombozyten und zum anderen die bereits vorstehend beschriebene Vasokonstriktion (Jurk und Kehrel, 2008). Als Teilschritt der primären Hämostase erfolgt eine Verknüpfung der Thrombozyten durch Fibrinogen und vWF. Thrombozyten besitzen an ihrer Oberfläche das Glykoprotein IIb/IIIa, welches als Rezeptor für Fibrinogen als auch vWF dient und der häufigste Rezeptor eines Thrombozyten ist (etwa 50.000 Moleküle pro Thrombozyt) (Niiya et al., 1987). Durch die Thrombozytenaktivierung ändert sich seine Konformation, so dass Fibrinogen bzw. vWF binden können. Zu den Membranrezeptoren des Thrombozyten im Allgemeinen gehören Toll-like-rezeptoren, Chemokinin-, Komplement-, Protease-aktive-, ADP-, TXA₂-Rezeptoren sowie Adhäsionsmoleküle. Diese Heterodimere vermitteln Interaktionen mit dem Extrazellulärraum (Laminin, Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen und dem Endothel) (Langer und Gawaz, 2010). Zusammenfassend können die Thrombozyten also über zwei Wege aktiviert werden: Über die Aktivierung durch Agonistenbindung (wie ADP, Thrombin) und über die Bindung an Kollagen oder den Von-Willebrand-Faktor. Der gebildete Pfropf, welcher die Blutung verhindert, wird durch ein Fibrinnetz stabilisiert, welches durch die kaskadenartigen Reaktionen der sekundären Hämostase entsteht. Er zeichnet sich durch eine spezielle Architektur aus, indem er sich in einen inneren Kern und eine äußere Schale gliedern lässt. Innen liegen die Thrombozyten dicht gepackt vor und sie sind größtenteils bereits degranuliert. Im Außenbereich sind die Thrombozyten weniger aktiviert (Stalker et al., 2013). Thrombozyten reagieren schnell auf aktivierende Stimuli mit Adhäsion, Formänderung, Degranulation und Sekretion (Polasek, 2004).

1.2.2 Sekundäre Hämostase

Das Ziel der sekundären Hämostase ist die Stabilisierung des im Rahmen der primären Hämostase gebildeten Thrombus. Die größte Rolle spielen hierbei die im Plasma befindlichen Gerinnungsfaktoren. Die Gerinnungsfaktoren sind zum großen Teil Proteasen, die

sich gegenseitig aktivieren und somit eine kaskadenartige Aktivierung auslösen. Dies sorgt zum einen für eine präzise Kontrolle des Gerinnungsprozesses und zum anderen für eine effektivere Bildung der Endprodukte Thrombin und Fibrin (Madlener und Pötzsch, 2010). Nach diesem Kaskadenmodell wird ein extrinsischer und ein intrinsischer Aktivierungsweg unterschieden, welche in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Das Modell ist jedoch nach aktuellem Erkenntnisstand nicht mehr ausreichend um die Verhältnisse im menschlichen Körper zu beschreiben. Verschiedene Prozesse laufen parallel ab, es gibt verschiedene Wechselwirkungen und Feedbackmechanismen. Die Abläufe der sekundären Hämostase lassen sich strukturiert in eine Phase der Initiation, der Amplifikation und der Propagation aufteilen.

Die Initiationsphase der sekundären Hämostase beinhaltet die Komplexbildung der beiden Faktoren III (Tissue Factor [TF]) und aktiviertem Faktor VII (FVIIa), welches dem extrinsischen Weg entspricht. Tissue Factor ist ein Membranprotein, welches auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert wird (Wilcox et al., 1989). Im physiologischen Zustand ist TF durch das Endothel von der Blutbahn getrennt und die Gerinnung wird nicht aktiviert. Bei einer Läsion tritt der an der Membranoberfläche haftende TF in Kontakt mit dem Blutplasma und dem in ihm zirkulierenden FVIIa. (Steppich und Ott, 2010). Der Komplex aktiviert dann sowohl Faktor X zu Faktor Xa als auch Faktor IX zu Faktor IXa. Faktor Xa aktiviert wiederum Faktor II zu Faktor IIa (Madlener und Pötzsch, 2010), also Prothrombin zu Thrombin. Die Menge an Thrombin, die allein durch den ersten Schritt in der Initiation gebildet wird ist jedoch nicht ausreichend und erfolgt zu langsam, um ausreichend Fibrin zu produzieren. Thrombin bindet jedoch an den GPIIb/IX und trägt zur Thrombozytenaktivierung bei, indem verschiedene Lipide von der Membrannenseite auf die Außenseite wechseln, wodurch auch eine Verknüpfung zur primären Hämostase gegeben ist. Zudem aktiviert Thrombin auch die Gerinnungskofaktoren VIII und V (Steppich und Ott, 2010). Hierbei wird Faktor VIII, der im Plasma an vWF gebunden vorliegt, aktiviert und frei und bindet an Phospholipidoberflächen (Hill-Eubanks et al., 1989). Hier lagert er sich mit Faktor IXa als Komplex zusammen und aktiviert weiteren Faktor X (Rawala-Sheikh et al., 1990). Nach der ersten Bildung von Thrombin entsteht also deutlich mehr Faktor Xa. Faktor Xa bindet zudem aktivierten Faktor V, welcher direkt

aus dem Thrombozyten stammt und als Kofaktor dient. Zusammen bilden sie den Prothrombinasekomplex, der die Wirkung von Faktor Xa um das zumindest 10.000-fache verstärkt (Müller, 2010). Dies bewirkt einen Thrombinburst (Madlener und Pötzsch, 2010), da nun Prothrombin schnell und in großen Mengen zu Thrombin aktiviert wird. Thrombin spaltet nun Fibrinogen zu Fibrin (Preissner, 2010), welches sich in Strängen zusammenlagert und den Thrombus stabilisiert. Eine weitere Funktion des Thrombin ist die Aktivierung von Faktor XIII (Janus et al., 1983), welcher aus den Fibrinfäden ein festes Netz bildet. Der Prozess der sekundären Hämostase ist also kein linearer Prozess, es gibt einige Wechselwirkungen und Feedbackschleifen.

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Ablauf der Gerinnungskaskade sind Kalziumionen. Diese sind von zentraler Bedeutung für die Bindung von Faktoren an die Membranoberflächen von Zellen. Bei Thrombozyten ändert sich durch ihre Aktivierung nicht nur ihre äußere Form, sondern auch die Lipidzusammensetzung der Lipiddoppelschicht ihrer Membran. Im aktiven Zustand gelangen durch den Flip-Flop-Mechanismus vermehrt negative Ladungen in die äußere Schicht (Heemskerk et al., 2002). An die negativ geladene Oberfläche können einige Gerinnungsfaktoren selbst nicht binden, da sie eine negative Ladung tragen. Dies betrifft die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X. Nach ihrer Synthese in der Leber erhalten sie durch eine posttranslationale Modifikation eine Carboxygruppe, welche an einem Glutamatrest angehängt ist (Preissner, 2010). Da das Blut im menschlichen Körper einen pH-Wert von 7,4 besitzt, liegt diese Carboxygruppe in deprotoniertem Zustand vor und trägt somit eine negative Ladung, welche sie an einer Bindung an einer negativen Oberfläche hindert. Als Kofaktor und Brücke zwischen der negativen Oberfläche und dem Gerinnungsfaktor dienen die Kalziumionen, welche zweifach positiv geladen vorliegen.

1.2.3 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse bewirkt eine Fibrinspaltung zur Destabilisierung und zum Abbau des Thrombus. Die Enzyme Urokinase und tissue-type-plasminogen-activator (t-PA) spalten Plasminogen zu Plasmin. Dieses spaltet Fibrin in seine Spaltprodukte wie etwa die D-Dimere. Eine Regulation des Prozesses erfolgt über den Plasminogen-Activator-Inhibitor (PAI) (Madlener und Pötzsch, 2010).

1.3 Thrombomodulin-Protein-C-System

Das Thrombomodulin-Protein-C-System vermittelt einen antikoagulatorisch wirkenden Prozess, durch welchen in erster Linie der Prothrombinasekomplex inhibiert wird. Hauptakteur des Systems ist das Protein C. Durch Abspaltung von 12 Aminosäuren an Position Arg169 durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex wird Protein C zur aktiven Serinprotease aPC aktiviert (Griffin et al., 2007). Mit seinem Kofaktor Protein S sorgt aPC für die proteolytische Spaltung der Faktoren Va und VIIIa. Protein S sorgt in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Phospholipiden für eine räumlich nähere Orientierung des Protein C hin zu den aus Phospholipiden bestehenden Membranen. Dadurch kann es die Rate an proteolytischen Spaltungen durch aPC an Faktor Va erhöhen (Norstrøm et al., 2003). Protein S besitzt ein Molekulargewicht von 71 kDa und seine Konzentration im Plasma beträgt etwa 25 mg/l. Zu etwa 60% befindet sich Protein S gebunden in einem Komplex mit C4BP (complement regulation C4b binding protein). Nur das zu etwa 40% frei vorliegende Protein S dient aPC als aktiver Kofaktor. Die Konzentration von aPC in Plasma beträgt unter physiologischen Bedingungen deutlich weniger als 1 ng/ml und das Enzym besitzt eine Halbwertszeit von etwa 20 Minuten. APC spaltet membrangebundenen Faktor V(a) proteolytisch an den Positionen Arg306, Arg506 und Arg679, wobei Arg506 kinetisch präferiert wird und weniger Protein-S-abhängig stattfindet. (Kalafatis et al., 1994) Kalafatis et al. fanden heraus, dass nur membrangebundener Faktor Va durch aPC gespalten und inaktiviert werden kann. Zudem ist der Schnitt an Arg506 nötig, um die Schnittstelle an Arg306 freizugeben (Kalafatis et al., 1994).

Die Schnittstelle Arg506 wird durch Faktor Xa vor der Proteolyse durch aPC geschützt. Protein S wirkt diesem inhibitorischen Effekt entgegen (Norstrøm et al., 2006). Aber auch Prothrombin wirkt einer proteolytischen Spaltung von Faktor Va entgegen. Prothrombin schützt die Schnittstellen Arg506 und Arg306 vor Proteolyse durch aPC, und zwar unabhängig von der Anwesenheit von Protein S (Tran et al., 2008). Faktor Va ist sowohl Substrat von aPC, als auch Kofaktor bei der aPC-vermittelten Inaktivierung von Faktor VIIIa.

Daneben vermittelt aPC auch profibrinolytische Effekte, indem es durch limitierte Proteolyse PAI inaktiviert. Insgesamt bildet aPC somit einen negativen Rückkopplungsmecha-

nismus der Gerinnungskaskade. Ein Mangel an Protein C oder Protein S kann entsprechende Krankheitsbilder mit verstärktem thromboembolischen Risiko auslösen (Vinnikov et al., 2010).

1.4 Faktor V

Faktor V (Proaccelerin) ist ein Gerinnungsfaktor, welcher, wie vorstehend bereits beschrieben, wichtige Funktionen der sekundären Hämostase erfüllt und essentieller Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes ist. Als nichtenzymatischer Kofaktor (Nesheim et al., 1979) bildet Faktor Va mit Faktor Xa, Kalziumionen und phospholipidhaltigen Membranoberflächen den Prothrombinase-Komplex, der den Thrombinburst bewirkt (Mann et al., 1981). Im Jahre 1947 wurde Faktor V von Paul Ovren entdeckt und seitdem konnten viele Erkenntnisse über die Struktur und den Aufbau des Proteins, die vielfältigen Funktionen und Regulationsmechanismen gewonnen werden. Das einzelsträngige Protein wird in der Leber synthetisiert (Nicolaes und Dahlbäck, 2002; Owen und Bowie, 1977; Wilson et al., 1984) und hat eine Molekülmasse von 330 kDa (Nesheim et al., 1979). Im Blut liegt Faktor V in einer Konzentration von ca. 7 mg/l vor (Tracy et al., 1982). Der strukturelle Aufbau lässt sich in Domänen gliedern: A1-A2-B-A3-C1-C2. Diese sind kovalent verbunden (Kane und Davie, 1986; Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Die Prokofaktor-Aktivität von Faktor V liegt unter 1%, seine volle prokoagulatorische Funktion erlangt er durch die Aktivierung zu Faktor Va (Dahlbäck, 2016; Nesheim et al., 1979; Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Dabei wird Faktor V in eine schwere und eine leichte Kette gespalten, welche nicht mehr kovalent verbunden sondern durch ein Kalziumion und hydrophobe Wechselwirkungen aneinander assoziiert sind (Asselta et al., 2006; Nesheim et al., 1979; Rosing et al., 2001; Rosing und Tans, 1997). Die schwere Kette besteht aus den Domänen A1 und A2, die leichte Kette aus den Domänen A3, C1 und C2 (Asselta et al., 2006; Rosing und Tans, 1997). Die B-Domäne wird im Rahmen der Aktivierung des Moleküls durch Thrombin abgespalten. Diese B-Domäne besitzt für die Funktion und den Aktivitätszustand des Faktor V besondere Regionen: Eine basische Region (FV-BR) liegt im Bereich der Aminosäuren 963-1008 (Petrillo et al., 2021). Eine saure Region (FV-AR1) befindet sich zwischen der A2- und der B-Domäne (AS 659-664/ 688-697) (Vadivel et al.,

2017). Eine zweite saure Region (FV-AR2) befindet sich im Bereich der Aminosäuren 1493-1537 am C-terminalen Ende der B-Domäne (Camire, 2016; Petrillo et al., 2021). Strukturell bilden die beiden Regionen FV-BR und FV-AR2 zu jeweils etwa 20% helikale Formen aus und besitzen keine Beta-Faltblattstrukturen (Vadivel et al., 2017). Bei der Aktivierung des Faktor V zu Faktor Va durch vollständige Proteolyse an Arg709, Arg1018 und Arg1545 werden die Regionen FV-BR und FV-AR2 mit der B-Domäne abgespalten. Diese Schnitte werden generiert durch Thrombin (Alpha-, Beta- und Meizothrombin) sowie Faktor Xa (Jenny et al., 1987; Mann et al., 1981; Monković und Tracy, 1990; Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Thrombin moduliert nicht nur die Aktivierung von Faktor V, sondern auch die von Faktor VIII, Faktor XI und von Thrombozyten durch Aktivierung von aktiviertem Protein C (Mann et al., 1997) Für eine optimale Kofaktoraktivität von Faktor V ist der Schnitt an Arg1545 und somit die vollständige Dissoziation der B-Domäne nötig (Bukys et al., 2006) Solange diese beiden Regionen im Faktor V-Molekül vorhanden sind, kann Faktor Xa nicht binden und der Prothrombinasekomplex somit nicht entstehen. Sie interagieren in der Art als autoinhibitorische Elemente miteinander, dass die Bindestelle für Faktor Xa blockiert ist (Camire, 2016; Petrillo et al., 2021; Vadivel et al., 2017). Die Entfernung von einer der beiden genannten Regionen reicht aus, um das Faktor V Molekül in einen aktiven Zustand zu überführen (Petrillo et al., 2021). Je nachdem, durch welche Schnitte Faktor V aktiviert wird, werden die Regionen abgespalten oder verbleiben am Molekül. Plasmatischer Faktor V, der weitestgehend inaktiv vorliegt, verliert durch eine vollständige Aktivierung durch die Schnitte an Arg709 und 1018 und einen schnell stattfindenden Schnitt an Arg1545 durch Thrombin die B-Domäne inklusive der FV-BR und der FV-AR2 Region und es entsteht Faktor Va. Durch eine Aktivierung durch Faktor Xa geschehen die Schnitte langsamer und zunächst nur an den Stellen Arg709 und 1018. Die proteolytischen Spaltungen an Arg709 und Arg1018 sind kinetisch präferiert (Dahlbäck, 2016; Norstrøm et al., 2003). Hierbei wird die Region FV-BR abgespalten, jedoch verbleibt FV-AR2 an der leichten Kette. Bei thrombozytärem Faktor V liegt eine teilweise proteolysierte Form des Faktor V vor. Oftmals ist auch hier schon die Region FV-BR abgespalten, während FV-AR2 noch gebunden ist (Camire, 2016; Vadivel et al., 2017). Das Gen, welches für Faktor V kodiert, liegt auf Chromosom 1q23, ist 80 kb lang

und besitzt 25 Exons. Es wird ein Präprotein aus 2224 Aminosäuren und einem Signalpeptid aus 28 Aminosäuren gebildet. Zur Struktur ist weiterhin bekannt, dass Faktor V 19 Cysteine besitzt, von denen 14 Disulfidbrücken bilden. Des Weiteren finden einige posttranslationale Modifikationen wie Sulfatierungen und Glykosylierungen statt (Asselta et al., 2006). Es lassen sich viele Glykosylierungen an der B-Domäne finden (Nicolaes et al., 1999; Rosing und Tans, 1997). Im kristallografischen Modell zeigen die A-Domänen eine Windmühlenform, welche sich um eine Pseudo-3fach gefaltete Achse anordnen (Nicolaes und Dahlbäck, 2002; Pellequer et al., 1998; Villoutreix und Dahlbäck, 1998). Faktor V weist strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Proteinen auf. Es wurden Homologien zwischen der schweren Kette des Faktor V und Faktor VIII sowie Coeruloplasmin festgestellt (Church et al., 1984). Es stellt sich eine zu 40 Prozent identische Aminosäuresequenz und Domänenstruktur der A und C Domänen der drei Proteine, sowie eine zu 14 Prozent identische B-Domäne der Faktoren V und VIII dar (Kane und Davie, 1986). In seiner aktivierten Form, Faktor Va, zeigt sich deutlich, dass 2 verschiedene Formen, Faktor Va1 und Faktor Va2 existieren. Diese unterscheiden sich in ihren Molekülmassen und Phospholipidbindefähigkeiten. Die schwere Kette besitzt in beiden Varianten eine Masse von 105 kDa, die leichte Kette jedoch bei Faktor Va1 74 kDa und bei Faktor Va2 71 kDa. Sie liegen im Blut im Verhältnis 30/70 vor. Die funktionellen Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlicher N-Glykosylierung an der Stelle Asn2181 in der C-Domäne (Nicolaes et al., 1999). Faktor Va1 bindet negativ geladene Phospholipide in geringen Konzentrationen weniger effizient und zeigt somit weniger prokoagulatorische Potenz, wogegen Faktor Va2 eine höheraffine Bindung eingeht. In höheren Konzentrationen zeigen beide Formen jedoch ähnliche Potenz (Nicolaes et al., 1999). Insgesamt ist die thrombinformende Kapazität von Faktor Va1 etwa 7fach höher (Hoekema et al., 1997; Nicolaes und Dahlbäck, 2002).

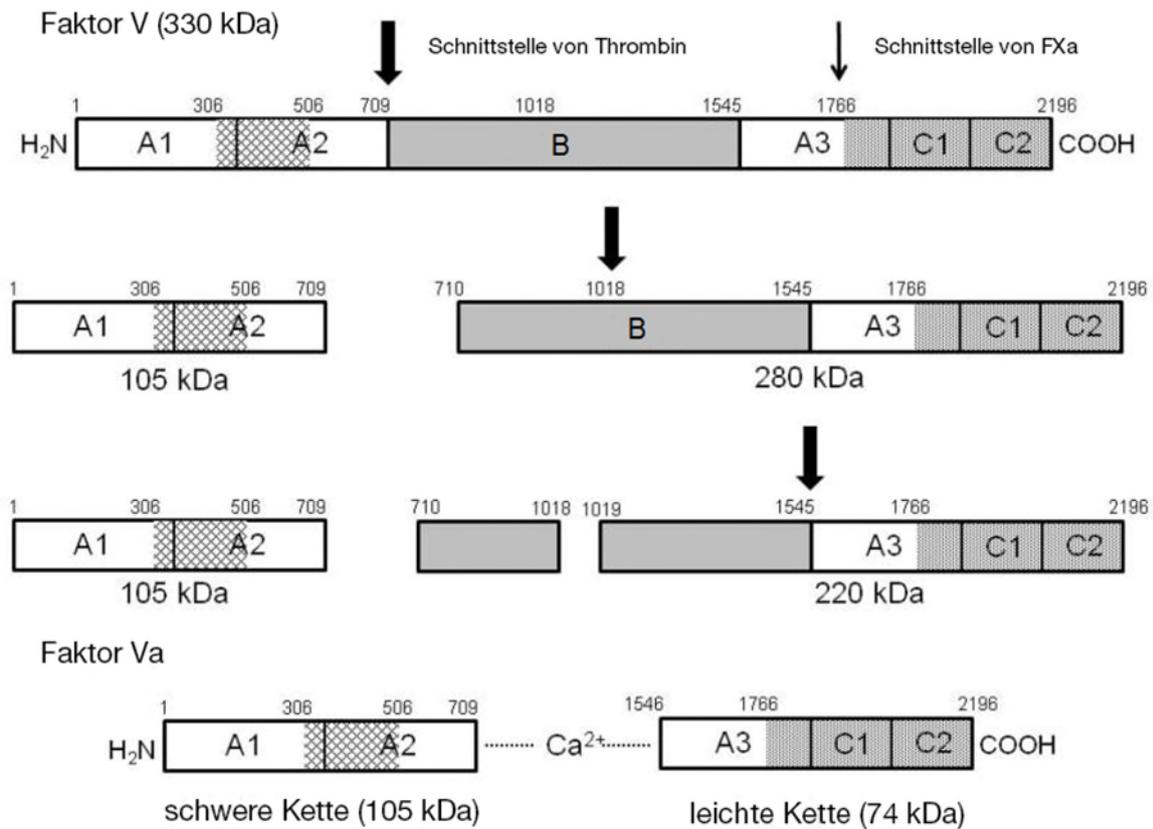


Abbildung 1: Struktur und Aktivierung von Faktor V

Gezeigt ist die schematische Aktivierung von Faktor V. Die dicken Pfeile geben die Spaltung an den Positionen 709, 1018 und 1545 durch Thrombin an. Der dünne Pfeil zeigt die Spaltung an Position 1766 bei Aktivierung durch FXa. Die entstehende schwere und leichte Kette ist nicht kovalent über Ca²⁺ verbunden (modifiziert nach Ayombil et al., 2013).

Die Inaktivierung von Faktor Va erfolgt ebenfalls über proteolytische Spaltungen: Diese erfolgen an der schweren Kette in der folgenden kinetischen Reihenfolge an den Stellen Arg506, Arg306 und Arg679 sowie Lys994 (Kalafatis et al., 1994). Hier werden die Schnitte durch aktiviertes Protein C (aPC) generiert. Damit geht die Kofaktoraktivität verloren (Kalafatis et al., 1994). Der Vorgang erfolgt biphasisch. Arg506 ist die kinetisch favorisierte Schnittstelle, die Spaltung hier erfolgt schnell und führt zu einem intermediären Zwischenprodukt mit partieller Kofaktoraktivität (Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Die vollständige Inaktivierung erfolgt durch den langsamer ablaufenden Schnitt an Arg306 (Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Eine komplette Spaltung bewirkt eine Änderung des Molekulargewichtes. Faktor Va besteht aus einer schweren Kette, die aus den Domänen A1

und A2 zusammengesetzt ist. Bei der Inaktivierung werden die Fragmente der Aminosäuren 307-505 (A2N) sowie 506-662 (A2C) herausgeschnitten. Diese entsprechen der A2-Domäne, welche dissoziiert (Mann et al., 1997). Die Spaltung an Arg506 bewirkt eine reduzierte Faktor Va-Aktivität und eine reduzierte Affinität zu Faktor Xa (Norstrøm et al., 2006). Zudem führt ein Schnitt an Arg647 durch Thrombin und die Anwesenheit von Endothel zu einer reduzierten Affinität zwischen schwerer und leichter Kette (Mann et al., 1997). Die Inaktivierung von Faktor Va wird stimuliert durch negativ geladene Phospholipide sowie Calcium und durch Protein S, dem Kofaktor von Protein C (Bakker et al., 1994; Rosing und Tans, 1997). Protein S unterstützt spezifisch die Spaltung an Arg306 und erhöht die Rate 20fach (Nicolaes und Dahlbäck, 2002; Rosing und Tans, 1997). Dies erfolgt abhängig von der Konzentration der Phospholipide, wobei Phosphatidylserin den potentesten Stimulator darstellt (Bakker et al., 1994). Auf der anderen Seite findet auch eine Inhibierung der Inaktivierung statt, und zwar durch Faktor Xa und Prothrombin. Faktor Xa inhibiert spezifisch die Spaltung an der Stelle Arg306, Prothrombin an den Stellen Arg506 und Arg306 (Tran et al., 2008). Bezüglich der unterschiedlichen Formen des Faktor V konnte festgestellt werden, dass Faktor Va1 sich 15fach weniger durch APC inaktivieren ließ als Faktor Va2 (Hoekema et al., 1997). Thrombozytärer Faktor V zeigt sich außerdem zwei- bis dreifach resistenter gegen eine Inaktivierung durch APC als plasmatischer Faktor V (Gould et al., 2004).

Nachdem Faktor V in der Leber synthetisiert wurde befindet er sich zu etwa 80 Prozent im Blutplasma und zu etwa 20 Prozent wird er in der Alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert (Chesney et al., 1981; Tracy et al., 1982). Ein Thrombozyt beinhaltet ca. 4.600 bis 14.000 Moleküle Faktor V, welche in Assoziation mit dem Bindeprotein Multimerin gespeichert sind (Asselta et al., 2006). Faktor V gelangt durch Endozytose aus dem Plasma in Megakaryozyten, die Vorläuferzellen des Thrombozyten. Dies geschieht über ein Zwei-Rezeptor-System, in dem LRP-1 und eine bislang unidentifizierte Bindungsseite beteiligt sind. Gesteuert wird die Endozytose durch die leichte Kette des Faktor V. Die Endozytose erfolgt clathrin- und calciumabhängig (Bouchard et al., 2005; Bouchard et al., 2008). Auch diese beiden Formen, plasmatischer Faktor V und thrombozytärer Faktor V unterscheiden sich in ihrer Funktion und Struktur. Die schwere Kette des thrombozytären

Faktor V besitzt nur 15 Prozent des Phosphoserins im Vergleich zum plasmatischen Faktor V und zeigt sich resistent gegen eine Phosphorylierung an Ser692 (Gould et al., 2004). Thrombozytärer Faktor V wird als teilweise proteolysiertes Molekül aus dem Thrombozyten ausgeschüttet, welches bereits signifikante Kofaktor-Aktivität besitzt, die durch Thrombin bzw. Faktor X nur noch zwei- bis dreifach gesteigert werden kann (Gould et al., 2004; Monković und Tracy, 1990). Bei einer Läsion findet sich dort thrombozytärer Faktor V in etwa 100fach höherer Konzentration als plasmatischer Faktor V (Nesheim et al., 1979). Insgesamt zeigt thrombozytärer Faktor V größere prokoagulatorische Aktivität (Monković und Tracy, 1990).

Die Funktion von Faktor V ist vielfältig. Er stellt einen zentralen Regulator der sekundären Hämostase dar, da er, wie vorstehend beschrieben, sowohl prokoagulatorische aber auch antikoagulatorische Eigenschaften besitzt. Er wirkt als lokaler Sensor der vorliegenden koagulatorischen Verhältnisse, da die Bestimmung der Funktion eines Faktor V Moleküls durch die momentane lokale Konzentration und Verfügbarkeit von pro- oder antikoagulatorischen Enzymen (Thrombin, Faktor Xa, APC) festgelegt wird (Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Die prokoagulatorische Aktivität stellt sich durch die Rolle als Kofaktor innerhalb des Prothrombinase-Komplex dar. Für die Effizienz des Prothrombinasekomplexes ist Faktor V essentiell. Faktor Xa kann allein eine katalysierte Aktivierung von Prothrombin bewirken. Diese Menge würde nicht ausreichen, um ausreichend Fibrin für die Gerinnung zu generieren. Die Aktivierung wird durch die Anwesenheit des gesamten Prothrombinasekomplexes um das ca. 278000fache verstärkt. Die einzelnen Bestandteile für sich betrachtend sorgen Calcium und Phospholipidmembranen für eine etwa 22fache, Faktor Va allein für eine etwa 13000fache Verstärkung der Aktivierung von Prothrombin durch Faktor Xa (Nesheim et al., 1979). Ohne die Anwesenheit von Faktor Va würde die Rate an generiertem Prothrombin etwa 1000fach reduziert (Dahlbäck, 2016). Dies ist das Resultat daraus, dass die leichte Kette des Faktor Va hochaffin an Phospholipidmembranen bindet und dann als Rezeptor für Faktor Xa und Prothrombin dient. Faktor Xa bindet an seine leichte und schwere Kette, Prothrombin nur an die schwere (Rosing und Tans, 1997). Die Anwesenheit von Faktor Va erhöht die Affinität zwischen Faktor Xa und Phospholipidmembranen ca. 100fach durch ein Rearrangement der Phospholipide, was für zu-

sätzliche Stabilität des Komplexes sorgt (Krishnaswamy, 1990). Verantwortlich für die optimale Interaktion ist der Aminosäurenbereich Asp683 - Arg709. Die Bindungen erfolgen calciumabhängig (Krishnaswamy, 1990). Nachdem eine initiale Thrombingenerierung erfolgt ist, kann sie um das ca. 400fache gesteigert werden durch positives Feedback durch Konversion von Faktor V zu Faktor Va (Nesheim et al., 1979). Antikoagulatorisch wirkt Faktor V durch eine Herunterregulierung der Faktor VIII-Aktivität. Hierbei übernimmt Faktor V eine Kofaktorfunktion für aPC. Diese Fähigkeit wird durch die Spaltung durch aPC an der Stelle Arg506 erhalten. Für seine Wirkung als Kofaktor wird das C-terminale Ende der B-Domäne benötigt (Thorelli et al., 1998). Wird Faktor V vollständig aktiviert, also an den Stellen Arg 709 und Arg 1545 gespalten und wird die B-Domäne abgespalten, verliert er diese Fähigkeit (Shen und Dahlbäck, 1994). Je nach Konzentration der beteiligten Enzyme und Aktivierung des Faktor V entscheidet sich die Funktion. Deshalb wird Faktor V auch als „Janusface-Protein“ bezeichnet (Nicolaes und Dahlbäck, 2002).

1.5 TFPI

Der Tissue Factor Pathway Inhibitor ist ein Glykoprotein, welches eine zentrale Rolle in der sekundären Hämostase einnimmt. Initial interagiert TFPI reversibel mit freiem FXa, in diesem ionischen Komplex bindet er dann FXa-abhängig an den Komplex aus TF und FVIIa und neutralisiert mit diesem Schritt die katalytische Aktivität des Komplexes. Damit wird die initiale Bindung von Thrombin limitiert (Steppich und Ott, 2010). Grundsätzlich existieren verschiedene Formen von TFPI, nämlich TFPI-Alpha und TFPI-Beta. TFPI-Alpha stellt die klassische Form des TFPI dar, welche etwa 90% des TFPI-Bestandes bildet, besteht aus 276 Aminosäuren und umfasst etwa 90-100% des löslichen, sezernierten TFPI und 80% des zellulär gebundenen TFPI. TFPI-Beta entsteht durch alternatives Spleißen, stellt etwa 10% des TFPI-Bestandes dar und besteht aus 192 Aminosäuren. Dieses wird nicht sezerniert, liegt aber membranassoziiert und zu 20% an Zelloberflächen gebunden vor (Steppich und Ott, 2010). TFPI kann als löslicher TFPI im Plasma vorliegen (10-50%), kann zellulär gebunden an Endothel gebunden sein (50-80%) oder kann thrombozytenassoziiert vorliegen (2-5%) (Steppich und Ott, 2010). Der thrombozytenassoziierte TFPI liegt ausschließlich als TFPI-Alpha vor, dieser wird von Megakaryozyten synthetisiert und von aktivierten Thrombozyten sezerniert (Steppich und Ott, 2010).

Hauptsyntheseort für TFPI sind die Endothelzellen, aber auch andere Zellen wie Thrombozyten sind zur Synthese in der Lage (Steppich und Ott, 2010). TFPI besitzt neben seiner Hauptfunktion als Inhibitor des FVIIa-TF-Komplexes enge Assoziationen zum Faktor V. TFPI-Alpha kann Formen des Faktor V binden und somit die Prothrombinasebindung inhibieren. Durch diese Regulation besitzt TFPI eine Schlüsselrolle bei der Thrombingeneration und bei der Limitierung des Thrombuswachstums auf Ebene des Prothrombinasekomplexes (Camire, 2016; Petrillo et al., 2021). Faktor V und TFPI bilden im Plasma einen Komplex, der auch die Stabilität des TFPI-Moleküls beeinflusst (Camire, 2016). Hierfür bindet das C-terminale Ende des TFPI-Alpha Moleküls an die FV-AR2 Region der B-Domäne des Faktor V. Es bestehen große Homologien zwischen diesem C-terminalen Ende, TFPI-Alpha-BR und der Region FV-BR auf dem Faktor V Molekül. Deshalb kann diese Struktur ähnlich effektiv eine Bindung an FV-AR2 vermitteln, wie es die Faktor V-eigene Region FV-BR im Stande ist. Dabei umfasst die TFPI-Alpha Domäne im Bereich der Aminosäuren 710-1545 die B-Domäne des Faktor V und bindet diese hochaffin (Vadivel et al., 2017). Die inhibitorischen Effekte der Bindung sind dabei ähnlich wie die Autoinhibition durch die Region FV-BR.

TFPI-Alpha kann verschiedene Formen des Faktor V binden. In thrombozytärem Faktor V liegt oftmals die Situation vor, dass durch teilweise Aktivierung und Proteolyse die Bindestelle für TFPI, die Region FV-AR2, freiliegt, und die Region FV-BR schon abgespalten ist. Diese Form kann von TFPI-Alpha gebunden werden. Auch in plasmatischem Faktor V, welcher vor allem durch FXa aktiviert wurde und erst an den Schnittstellen Arg709 und 1018 geschnitten wurde, liegt diese Situation vor und es kann eine Inhibition durch TFPI durch entsprechende Bindung erfolgen (Wood et al., 2013). Vollständig intakte Faktor V Moleküle kann TFPI nicht binden, da dort sowohl die Region FV-AR2 als auch die Region FV-BR im Molekül vorhanden sind. Hier liegt die Bindestelle für TFPI-Alpha nicht frei vor, sondern ist eng an FV-BR assoziiert. Auch vollständig aktivierter Faktor Va kann von TFPI nicht gebunden werden, da hier durch die Abspaltung der B-Domäne die Bindestelle FV-AR2 abgespalten wurde. Insgesamt sind also für eine TFPI-Bindung Schnitte an Arg709 und 1018 nötig, sobald eine vollständige Aktivierung zu Faktor Va durch einen Schnitt an Arg1545 erfolgt, ist keine Bindung mehr möglich. Es gibt jedoch grundsätzlich Hinweise, dass auch Faktor Va mit TFPI im Plasma interagiert. Zusammenfassend kommt so vor

allem TFPI-Alpha eine inhibitorische Funktion in der Initialphase der Gerinnung zu (Camire, 2016; Petrillo et al., 2021; Vadivel et al., 2017; Wood et al., 2013).

1.6 Faktor V-short und TFPI

Neben dem oben beschriebenen Faktor V existiert eine verkürzte Variante des Proteins, der Faktor V-short. Er stellt eine durch Splicing entstandene Isoform von Faktor V dar, welcher ein großer Teil der B-Domäne fehlt (AS 756-1458) (Camire, 2016). Diese Form stellt eine aktivierte Form des Faktor V, ähnlich wie Faktor Va dar, ohne jedoch durch einen Schnitt durch Thrombin oder Faktor Xa aktiviert werden zu müssen. Dies liegt daran, dass von den beiden autoinhibierenden Regionen auf der B-Domäne, welche, wenn sie beide im Molekül vorhanden sind, eine Aktivierung des Faktor V verhindern, nur noch die Region FV-AR2 vorhanden ist. Eine besondere Funktion der Variante besteht in der hochaffinen Bindungsfähigkeit an TFPI. Diese Fähigkeit wird durch die verkürzte B-Domäne erklärt, welche die hochaffine Bindestelle für TFPI enthüllt. Diese liegt in einer sauren Region FV-AR2 auf der B-Domäne (AS 1493-1537) (Camire und Bos, 2009; Kalafatis et al., 1994; Vincent et al., 2013). Diese Region FV-AR2 des Faktor V-short kann von der TFPI-Alpha-BR Region gebunden werden (Petrillo et al., 2021). In diesem Zusammenhang fungiert Faktor V-short gemeinsam mit Protein S als synergischer Kofaktor zu TFPI und unterstützt so die Inhibierung von Faktor Xa. Faktor V-short und TFPI zirkulieren im Plasma als Komplex. Die Kofaktoraktivität geht in dem Moment der Aktivierung durch den Thrombin-vermittelten Schnitt an Arg1545 an Faktor V-short verloren (Dahlbäck, 2017). Faktor V-short ist der gewöhnliche Träger von TFPI im Plasma, kommt jedoch in einer etwa 100-fach geringeren Konzentration vor als Faktor V (Vincent et al., 2013). Beim Krankheitsbild des East Texas Bleeding kommt es zu einer Mutation in der für die B-Domäne kodierenden Region, welche eine Splice Donor Seite aktiviert, (Camire und Bos, 2009). Diese in-frame Deletion führt ebenfalls zur Bildung von Faktor V-short (Broze und Girard, 2013; Vincent et al., 2013). Patienten mit dieser Mutation besitzen höhere Konzentrationen an Faktor V-short, und auch die Konzentration von TFPI ist um das etwa 10-fache erhöht. Es resultiert ein erhöhtes Blutungsrisiko durch die verstärkte Inhibierung von Faktor Xa.

1.7 Faktor V Leiden / APC-Resistenz

Faktor V Leiden bezeichnet eine autosomal dominant vererbte Punktmutation im Faktor V Gen, welche ein erhöhtes Thromboserisiko zur Folge hat (Albagoush et al., 2022). Bertina et al. beschrieben die Mutation an Position 1691 des Faktor V Gens, welche zu einem Austausch von Glu506 durch ein Arginin führt (Bertina et al., 1994). Diese Stelle des Arg 506 stellt gleichzeitig die Schnittstelle für APC dar, welches in normaler Hämostasefunktion für eine proteolytische Inaktivierung des Faktor Va sorgt. Das dadurch entstehende Faktor V Molekül (Faktor V Leiden bzw. FV Q506) zeigt sich resistent gegen eine Inaktivierung durch APC. Die Ausprägung in einem thrombophilen Phänotyp beschrieb zuvor (Dahlbäck et al., 1993), wobei die Mutation als Ursache noch unbekannt war. Sie untersuchten die Gerinnung eines Patienten mit familiär gehäuft vorkommenden thromboembolischen Ereignissen anhand eines APTT Assays. Die APC-Resistenz zeigte sich durch eine schwache antikoagulatorische Reaktion des Patientenplasmas auf die Zugabe von APC. Aus dieser ausbleibenden APTT-Verlängerung der Gerinnungszeit konnte er das erhöhte thromboembolische Risiko dieser Patienten begründen. Die Inaktivierungsrate von Faktor Va ist um das etwa 10-fache langsamer als normal (Kujovich, 2011). Eine dominante Vererbung dieses Gerinnungsdefektes wurde anhand der familiären Häufung bereits vermutet (Dahlbäck et al., 1993). Es wird als Ursache der Mutation ein einziges Mutationsereignis vor etwa 20.000-30.000 Jahren vermutet, welches sich daraufhin ausgebreitet hat (Kujovich, 2011). Die Thrombophilie ist mit zwei Mechanismen begründbar. Zum einen wird prokoagulatorisch wirkender Faktor Va durch APC durch die Resistenz langsamer inaktiviert. Zum anderen verliert Faktor V durch die Mutation auch seine Funktion als Kofaktor von APC bei der Inaktivierung von Faktor VIIIa (Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Statistisch gesehen sind etwa 5-8% der kaukasischen Bevölkerung von der Mutation betroffen, tendenziell im Norden Europas mehr als im Süden. Damit stellt die Faktor V Leiden Mutation den häufigsten angeborenen Thromboserisikofaktor dar, etwa 40-50% aller vererbten Thrombophilien werden durch die Faktor V Leiden Mutation verursacht (Kujovich, 2011). Dabei ist die Prävalenz der Mutation unter Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose höher als bei Patienten mit einer Lungenembolie (Kyrle et al., 2010). Koster et al. explorierten in ihrer Studie, dass unter den Patienten mit einer venösen Thrombose 21% die Mutation trugen, unter gesunden Probanden nur 5% (Koster et al.,

1993). Sie beschrieben ein etwa 8-fach erhöhtes Risiko für das Erstereignis einer venösen Thrombose für heterozygote Mutationsträger und ein etwa 80-fach erhöhtes Risiko für homozygote Mutationsträger. Da viele der Mutationsträger in ihrem Leben kein thromboembolisches Ereignis erleiden werden, ist die Entscheidung zur Intervention im Sinne einer Risikoreduktion durch medikamentöse Gerinnungshemmung eine schwierige Frage, welche klinische Erfahrung benötigt (Albagoush et al., 2022). Das Risiko eines thromboembolischen Ereignisses ist bei Mutationsträgern, welche Blutsverwandte besitzen, bei denen ebenfalls ein Ereignis aufgetreten ist, höher als bei Mutationsträgern ohne bekannte Ereignisse in der Familie (Kujovich, 2011). Camire et al. fanden heraus, dass nicht nur die Faktor V Leiden Variante des Faktor V zu einer inkompletten Inaktivierung durch APC führt. Plasmatischer Faktor V wird durch APC komplett inaktiviert. Thrombozytärer Faktor V wird jedoch in ähnlichem Maße wie Faktor V Leiden nur inkomplett inaktiviert. Dies ließ darauf schließen, dass Thrombozyten die Schnittstelle des thrombozytären Faktor V vor der Spaltung durch APC schützen. Thrombozytärer und plasmatischer Faktor V scheinen also unterschiedliche Substrate für APC zu sein (Camire et al., 1998a).

1.8 Faktor V Mangel

Der Faktor V Mangel stellt eine seltene Blutungsstörung dar, die mit verringerten Plasmakonzentrationen von Faktor V einhergeht und zu schweren Blutungssymptomen führen kann. Ein vererbter Faktor V Mangel kommt mit einer Prävalenz von lediglich 1:1 Million in der Gesamtbevölkerung vor. Die Krankheit wird autosomal-rezessiv vererbt und tritt vor allem in Regionen der Welt auf, in denen Konsanguinität der Eltern gehäuft vorkommt. Es gibt auch eine erworbene Form des Faktor V Mangels, welcher durch Antikörper gegen Faktor V entsteht, ausgelöst beispielsweise durch Kontakt zu bovinem Thrombin, FFP oder Antibiotika (Asselta und Peyvandi, 2009; Tabibian et al., 2019). Es wurden mehrere Fallstudien von betroffenen Patienten beschrieben. Klinisch fallen vor allem homozygote Träger der Mutation mit Schleimhautblutungen auf, wie Epistaxis, Menorrhagie oder Mundhöhlenblutungen, aber auch mit verstärkten postoperativen Blutungen und Hämatomen (Lak et al., 1998). Diagnostisch fallen die Patienten mit verlängerter Prothrombinzeit und verlängerter aktivierten partiellen Thromboplastinzeit auf. Auch Faktor V Aktivitätstests können angewendet werden (Tabibian et al., 2019). Der Faktor V Mangel wird klinisch in drei Gruppen unterteilt. Bei der milden Form bestehen Plasmaaktivitätslevel von

Faktor V von noch über 10%, diese Patienten zeigen sich häufig asymptomatisch und es liegt oft nur die heterozygote Form der Mutation vor. Bei der moderaten Form liegen die Konzentrationen unter 10% aber noch im detektierbaren Bereich des normalen Niveaus und bei der schweren Form ist kein Faktor V im Plasma detektierbar. Es wurden Zusammenhänge gefunden, dass Patienten mit niedrigen Plasmaspiegeln an Faktor V, jedoch mit normalen Konzentrationen an thrombozytärem Faktor V, weniger Blutungssymptome zeigten (Song et al., 1987). Ein milder Phänotyp scheint mit der Anwesenheit von thrombozytärem Faktor V und auch von niedrigen TFPI-Spiegeln zusammenzuhängen (Tabibian et al., 2019). Therapiert wird der Faktor V Mangel oftmals mit FFP, um die Faktor V Plasmalevel über etwa 20% zu halten. Diese Therapieform bringt jedoch negative Nebeneffekte mit sich, wie eine Volumenüberbelastung des Kreislaufes, oder auch des Risikos einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz. Diese Nebenwirkungen werden mit der alternativen Therapie einer Thrombozytentransfusion umgangen. Diese zeigt einen effektiven prokoagulatorischen Effekt für die Therapie der Blutungssymptome. Als neue Therapiemethode wird ein aus Plasma abgeleitetes Faktor V Konzentrat diskutiert (Tabibian et al., 2019).

1.9 Thrombozyten

Morphologie

Thrombozyten sind die kleinsten und nach den Erythrozyten die häufigsten im Blut zirkulierenden Zellen mit einem Durchmesser von etwa 2-3 μm (Gremmel et al., 2016; Koupenova et al., 2018; Thon und Italiano, 2012). Das Volumen beträgt etwa 6-10 fl und die Dicke 0,5 μm (Gremmel et al., 2016). Sie haben eine diskoide Form und sind anukleär, besitzen jedoch RNA (Koupenova et al., 2018; Lindemann et al., 2001; Thon und Italiano, 2012). Im Plasma überleben sie circa 7-10 Tage (Avecilla et al., 2004; Ghoshal und Bhattacharyya, 2014). Der Mensch besitzt etwa 1 Trillion Thrombozyten, etwa $150\text{-}400 \times 10^9$ pro Liter (Avecilla et al., 2004; Jurk und Kehrel, 2010). Zwei Drittel der Thrombozyten befinden sich regulär in der freien Zirkulation des Blutes, ein Drittel wird in der Milz gespeichert (White, 1968). Im ruhenden Thrombozyten befinden sich etwa 1500 Proteine, von denen 190 Membranproteine und 262 Phosphoproteine sind (Qureshi et al., 2009).

Ein Zonenmodell erklärt den Aufbau des Thrombozyten adäquat. Er lässt sich in eine periphere, eine Sol-Gel-, eine Organellenzone sowie verschiedene Membransysteme einteilen (Gremmel et al., 2016; Mancuso und Santagostino, 2017). Die periphere Zone besteht aus der Zellmembran mit einer dicken Glykokalyx, welche zahlreiche kleinste Falten und Öffnungen des offenen kanalikulären Systems OCS besitzt. Diese stellen bei der Aktivierung des Thrombozyten weitere Membran zur Verfügung (White und Escolar, 1993). Unterhalb der Glykokalyx befindet sich eine undehnbare Lipiddoppelschicht (White und Conard, 1973). Die Phospholipide sind auf der Innen- und Außenseite asymmetrisch angeordnet. Negativ geladenes Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol befinden sich vor allem auf der Innenseite, was dafür sorgt, dass der Thrombozyt in seinem nicht-koagulatorisch aktivem Zustand verweilt. Eine ATP-abhängige Flipase sorgt für ihre Position an der Innenseite. Bei der Thrombozytenaktivierung wird dagegen die Flopase aktiv. Diese exponiert sie auf die Außenseite (Heemskerk et al., 2002). In Form von Glykoproteinen besitzt der Thrombozyt in der Phospholipiddoppelschicht bewegliche Rezeptoren und Komplexe wie den GPIIb-IX-V Komplex, sowie Integrin AlphaIIb β 3 (GPIIbIIIa) auf seiner Oberfläche (White et al., 1995). In nicht-aktivierter Form beinhaltet die Lipiddoppelschicht Gewebefaktor (TF) mit negativ geladenem Phosphatidylserin. Wird der Thrombozyt aktiviert, setzt er Mikropartikel frei, die zusammen mit dem TF dann die Faktoren Va, VIIa und Xa binden können (Del Conde et al., 2005). Der submembranäre Bereich ist essentiell für die Thrombozytenfunktion, da sich dort ein System von Aktinfilamenten befindet, welches die Formänderung des Thrombozyten bei seiner Aktivierung bewirkt und Partikel auf die Zelloberfläche transportiert (Gremmel et al., 2016). Die Sol-Gel-Zone besteht aus einer viskösen Matrix, Mikrotubuli, Mikrofilamenten, Glykogen und Vesikeln sekretorischer Organellen. Die Mikrotubuli bilden das kontraktile Zytoskelett (Behnke, 1967; Haydon und Taylor, 1965). Zudem sorgen sie für die diskoide Gestalt des Thrombozyten (White, 1968). Hauptbestandteile stellen das Spektrin-basierte Membranskelett und das Aktinzytoskelett (Thon und Italiano, 2012). In der Organellenzone befinden sich mit der Alpha-Granula, der dichten Granula und den Lysosomen drei sekretorisch aktive Organellen (Koupenova et al., 2018). Die Sekretion der Granula erfolgt in das offene kanalikuläre System (Escolar et al., 1986). Daneben besitzt ein Thrombozyt auch Mitochondrien, ein Glykosom, ein Endoplasmatisches Retikulum und einen Golgiapparat.

Alpha-Granula:

Alpha-Granula sind wichtige Organellen des Thrombozyten und erfüllen wichtige Aufgaben, die essentiell für die Thrombozytenfunktion sind. Entdeckt und differenziert in Alpha- und Dense-Granula wurde sie 1966 (Tranzer et al., 1966). Durch Fusion der Granula kann zusätzliche Membran zur Oberflächenvergrößerung bereitgestellt werden. Durch die Aktivierung des Thrombozyten durch Kollagen, Thrombin oder dem vWF sezerniert die Alpha-Granula zudem unter Anderem koagulatorisch aktive Substanzen sowie Rezeptoren und Membranproteine. Die Hauptfunktion der Granula ist die Speicherung von Molekülen und Proteinen (Gremmel et al., 2016). Diesen Inhalt erhält die Granula auf zwei verschiedenen Wegen: Zum Teil werden Bestandteile der Granula endogen synthetisiert und dann gespeichert, oder durch rezeptorvermittelte Endozytose aus dem Plasma aufgenommen und in Granula verpackt. Faktor V wird über den als Rezeptor wirkenden PGI₂ aufgenommen (Camire et al., 1998b). Wird der Thrombozyt aktiviert, fusionieren die einzelnen Granula und sezernieren ihren Inhalt ins OCS. Ein Thrombozyt besitzt 40 bis 80 einzelne Granula, welche somit seine häufigste Organelle darstellt (Flaumenhaft, 2003). Bei der Aktivierung der Thrombozyten werden membranassoziierte Proteine auf der Zelloberfläche exponiert und lösliche Proteine freigesetzt., wobei etwa 300 Proteine aus der Alpha-Granula freigesetzt werden per Exozytose und Fusion mit dem OCS (Brandt et al., 2000; Jurk und Kehrel, 2010; Maynard et al., 2007; Stenberg et al., 1984; White und Escolar, 1991). Die Alpha-Granula setzt neben Integrinen auch pro- und antikoagulatorisch wirksame Proteine frei wie die Gerinnungsfaktoren V, IX und XIII, Antithrombin, Protein S, Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Plasminogen, Kininogen (Mancuso und Santagostino, 2017) und Alpha-2-Makroglobulin (Gremmel et al., 2016). Ebenfalls gespeichert werden Adhäsionsmoleküle wie Fibrinogen, vWF und Thrombospondin. Die Freisetzung von Alpha-Granula verstärkt insgesamt die Thrombozytenaktivierung (Cramer und Berger, 1996).

Dichte Granula:

Dichte Granula speichern ebenso wie Alpha-Granula Stoffe und Substanzen, die für die Thrombozytenfunktion essentiell sind. Sie besitzen einen Durchmesser von etwa 180 bis 250 nm und durch Sekretion ihres Inhaltes sind sie in der Lage, bei einer Gefäßläsion

weitere Thrombozyten zu rekrutieren (Thon und Italiano, 2012). Ein Thrombozyt beinhaltet etwa 3 bis 8 der dichten Granula, welche kleiner sind als die Alpha-Granula und eine variable Morphologie aufweisen. Sie speichern und sezernieren unter Anderem ADP, ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} und K^{+} (Gremmel et al., 2016). ADP sorgt für die weitere Freisetzung von Granula, die Formänderung des Thrombozyten, die Rekrutierung weiterer Thrombozyten und unterstützt die Aggregation (Thon und Italiano, 2012).

Produktion

Die Thrombozyten stammen von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, ab. Sie entstehen im Knochenmark aus ihrer pluripotenten Stammzelle (Ogawa, 1993). Die Megakaryozyten sind 30 bis 300 μm im Durchmesser groß und können jeweils 1000 bis 3000 (Stenberg und Levin, 1989), insgesamt pro Tag etwa 100 Milliarden neue Thrombozyten herstellen. Grundsätzlich läuft die Produktion in mehreren Stadien ab. Der Megakaryozyt reift zunächst zu Proplättchen, indem er mehrere lange Ausläufer bildet, welche sich später in die Sinusoide des Knochenmarks abschnüren (Avecilla et al., 2004). Diese konvertieren dann zu Präplättchen des Durchmessers von etwa 2 bis 10 μm . Durch ihre Abschnürung werden sie dann als Thrombozyten freigesetzt (Thon und Italiano, 2012). Es sind also die Proplättchen, nicht der Megakaryozyt, welche die Thrombozyten freisetzen (Junt et al., 2007).

Bevor der Megakaryozyt seine Zellabschnürungen vornimmt, durchläuft er viele chromosomale Duplikationen ohne Zellteilung (Ravid et al., 2002) und erhöht hierdurch sein Zytoplasmavolumen auf einen Durchmesser von etwa 100 μm . Auf diesem Wege synthetisiert er füllt sich auch mit Granula, anderen Organellen, Zytoskelett und Membransystemen (Bluteau et al., 2009). Die Produktion der Thrombozyten unterliegt einer komplexen Regulierung. Die Zellen des Knochenmarks (PA6-Stromazellen) verstärken das Wachstum und die Proliferation des Megakaryozyten, sobald dieser sich an sie anheftet und verhindert die Produktion von Proplättchen (Nagahisa et al., 1996). Es wird angenommen, dass im peripheren Blut die Reifung der Thrombozyten fortgesetzt wird, da viele der freigesetzten Fragmente des Megakaryozyten noch unverzweigt sind und wesentlich größer

sind als die Thrombozyten (Junt et al., 2007). Scherkräfte im Blutstrom scheinen den Prozess des Übergangs von Proplättchen zu Thrombozyten zu unterstützen, da in Gefäßen vor den pulmonalen Arterien viele Proplättchen gefunden werden können, in nachgeschalteten Gefäßen dagegen viele Thrombozyten (Thon und Italiano, 2012).

Funktionen, Sekretion, Interaktionen

In der frühen Phase der Sekretion werden vor allem Fibrinogen, Thrombospondin und vWF freigesetzt (Cramer und Berger, 1996). Durch die Expression des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa wird die irreversible Aggregation initiiert (Cramer und Berger, 1996). Bei hohen Scherkräften entfaltet sich aus dem Plasma stammender vWF und lagert sich an das subendotheliale Kollagen an. In der entfalteten Form gibt er eine Bindeseite für das GPIb (CD42) frei, welches Teil des GPIb-IX-V Komplexes ist. Über diese Verbindung adhärirt der Thrombozyt (Jurk und Kehrel, 2008; Koupenova et al., 2018). Dies vermindert die Flussgeschwindigkeit des Thrombozyten so, dass dann auch eine Interaktion über das GPVI direkt an die Kollagenfibrillen möglich wird. Über den GPIb-IX-V Komplex kann der Thrombozyt neben Kollagen auch Leukozyten und Endothel binden. An das Endothel bindet er bei hohen Scherkräften über Thrombospondin-1 aus dem Endothel (Ruggeri, 2007). Der GPIb-IX-V Komplex hält zudem eine Bindestelle für Alpha-Thrombin bereit. Für die Kollagenbindung bedeutet der Glykoproteinkomplex eine eher lose Verknüpfung (Savage et al., 1996). Erst wiederholter Kontakt zum vWF initiiert eine feste Adhäsion (Jurk und Kehrel, 2010). Thrombozyten interagieren neben Kollagen auch mit dem Endothel. Bei geringen Scherkräften verwendet der Thrombozyt das GPIbAlpha um über den vWF an das Endothel zu binden. Bei hohen Scherkräften verwendet er diesen auch, sowie das P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL1) um über P-Selektin an das Endothel zu binden („Thrombozytenrollen“) (Koupenova et al., 2018). Die prokoagulatorischen Fähigkeiten des Thrombozyten und seine Einflüsse auf die Thrombingenerierung können wie folgt beschrieben werden: Sobald das periphere Blut das subendotheliale Gewebe erreicht, liegt der Gewebefaktor TF exponiert vor. Dies ist die initiale Voraussetzung für die Thrombingeneration (Koupenova et al., 2018). Durch den Kontakt mit den Gewebefaktor-tragenden Zellen wie Fibroblasten und die Bindung des TF (Faktor VIIa) wird die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Produktion von Faktor Xa und Thrombin

steht. Diese Menge an Thrombin ist zu gering um genug Fibrin für ein stabiles Netz herzustellen, aktiviert jedoch weitere Thrombozyten sowie die Faktoren V, VIII und XII. Die Tenase und die Prothrombinase ordnen sich auf der Thrombozytenoberfläche an (Jurk und Kehrel, 2008). Thrombozyten sind also das Zentrum der explosivartigen Thrombinvermehrung. Eine entscheidende prokoagulatorische Komponente stellt das negativ geladene Phosphatidylserin dar. Seine Präsentation auf der Plasmamembran ist nötig für die Funktion des Tenase- und des Prothrombinasekomplexes (Heemskerk et al., 2002). Die negativ geladenen Phospholipide sind nötig, aber nicht ausreichend für die Thrombingenerierung. Auch die einzelnen Gerinnungsfaktoren müssen an die Membran binden (Jurk und Kehrel, 2008). Xa bindet die Thrombozytenmembran an der identischen Stelle an der Faktor V gebunden wird. Dieser verstärkt die Faktor Xa-Bindung (Chesney et al., 1981). Damit Thrombin seine eigene Vermehrung auf der Zelloberfläche induzieren und für die Induktion des prokoagulatorischen Zustandes der Zelle sorgen kann, ist die Bindung über das GPIIb und die Aktivierung über PAR-1 und-4 nötig (Dörmann et al., 2000; Jurk und Kehrel, 2008). Neben diesen in die Hämostase eng involvierten Proteinen nimmt auch das Chemokin CXCL4 (PF4) Einfluss auf die Hämostase. Es verstärkt die Thrombinvermittelte Generierung von aPC, indem es Thrombomodulin zur Gla-Domäne des Protein C überbrückt (Kowalska et al., 2007).

1.10 Thrombozytärer Faktor V

Wie oben beschrieben befinden sich etwa 20% des Faktor V Pools in der Alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert (Chesney et al., 1981; Hayward et al., 1995). Es gibt zwei Theorien wie Faktor V in den Thrombozyten gelangt. Eine Möglichkeit stellt die endozytische Aufnahme des plasmatischen Faktor V dar (Giampaolo et al., 2005). Die andere ist die endogene Synthese durch den Megakaryozyten (Giampaolo et al., 2005; Hayward et al., 1995). Studien haben gezeigt, dass zum einen eine clathrin- und calciumabhängige Endozytose (Bouchard et al., 2005; Bouchard et al., 2008) zum Anderen aber auch eine Synthese von Faktor V stattfindet (Sun et al., 2003). Faktor V liegt im Thrombozyten in den Alpha-Granula gebunden als Komplex an Multimerin vor, welches als Trägerprotein fungiert. Es bindet spezifisch Faktor V, Faktor Va bzw. die leichte Kette des Faktor Va,

nicht aber die schwere Kette. Faktor Va kann die Thrombozytenmembran bei der Thrombozytenaktivierung multimerinunabhängig binden (Chesney et al., 1981). Hierbei bindet es an negativ geladene Phospholipide (Hayward et al., 1995). Dort nimmt Faktor Va am Prothrombinasekomplex teil und dient als Rezeptor für Faktor Xa (Nesheim et al., 1979; Tracy et al., 1982). Bei der Thrombozytenaktivierung dissoziiert Faktor Va von Multimerin (Hayward et al., 1995). ADP verursacht bei der Thrombozytenaktivierung eine Freisetzung von etwa 5% des Faktor V aus der Alpha-Granula, Kollagen von etwa 25% (Chesney et al., 1981). Dieser freigesetzte Anteil besteht vor allem aus der prokoagulatorischen Form (Chesney et al., 1981).

1.11 Zielsetzung und Fragestellung

Über die Struktur und die Funktionen des Faktor V wurden über die letzten Jahrzehnte durch intensive Forschung viele Informationen gewonnen. Auch konnten viele Erkenntnisse über den sich von plasmatischem Faktor V stark unterscheidenden thrombozytären Faktor V erworben werden, welchem eine besondere Bedeutung in der Hämostase zukommt. So beträgt sein Anteil am Gesamtbestand von Faktor V etwa 20%, und funktionell agiert er durch seine teilweise schon im Thrombozyten stattfindende Proteolyse als aktivierter Gerinnungsfaktor. Vor allem bei lokalen Gerinnungsprozessen ist diese Form des Faktor V von Bedeutung. So wie es auch beim Krankheitsbild der Faktor V Leiden Mutation der Fall ist, zeigt sich thrombozytärer Faktor V resistenter gegen eine Inaktivierung durch aPC. Genauere qualitative und quantitative Bestimmungen von thrombozytärem Faktor V bzw. das Verhältnis von Faktor V und Faktor Va im Thrombozyten sind bislang nicht erfolgt.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war eine quantitative und qualitative Messmethode zu entwickeln, mit welcher plasmatischer und thrombozytärer Faktor V spezifisch gemessen werden können. Hierfür soll ein antikörperbasierter Ansatz durch Entwicklung mehrerer Sandwich-ELISA entwickelt werden. Durch unterschiedliche spezifische Messfähigkeiten sollen Aussagen über die Menge und Verteilung von plasmatischem und thrombozytärem Faktor V getroffen werden. Diese Informationen könnten der differenzierten Analyse von Patientenproben dienen, um etwa ein Urteil über die Wahrscheinlichkeit von thromboembolischen Ereignissen bei Krankheitsbildern wie der Faktor V Leiden Mutation oder über

das tatsächliche Blutungsrisiko bei Faktor V Mangel Patienten zu treffen und über die Indikation von therapeutischen Maßnahmen zu entscheiden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Merck KGaA: KCl, NaH₂PO₄, Glucose, MgCl₂, Na-Citrat, Zitronensäure, HCl, CaCl₂, Natriumazid (NaN), Harnstoff, Na₂CO₃, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, HEPES

VWR International GmbH: NaCl

Kmf Laborchemie Handels GmbH: NaHCO₃

Carl Roth GmbH + Co. KG: NaOH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH: Tris-HCl 1M, H₂O_{dest}

Vollblutproben (in EDTA-Röhrchen in ACD-Puffer) von zufällig ausgewählten Blutspendern (männlich und weiblich, keine Altersbeschränkungen), gewonnen über eine separate Blutentnahme

2.1.2 Verwendete Pufferlösungen und Verdünnungsmedien

Waschpuffer für die Thrombozytenlysate: $5,266 \cdot 10^{-2}$ mM BSA, 136,9mM NaCl, 2,68mM KCl, 1,19mM NaHCO₃, 0,42mM NaH₂PO₄, 6,1mM Glucose, mit H₂O_{dest} auf 500ml auffüllen, pH 6,4 einstellen und 1,5 ul Bivalirudin hinzufügen.

Suspensionspuffer für die Thrombozytenlysate: $5,266 \cdot 10^{-2}$ mM BSA, 136,9mM NaCl, 2,68mM KCl, 1,19mM NaHCO₃, 0,42mM NaH₂PO₄, 6,1mM Glucose, 2,1mM MgCl₂ mit H₂O_{dest} auf 500ml auffüllen, pH 7,4.

ACD-Puffer (Acid-Citrate-Dextrose) für die Thrombozytenlysate: 96,87mM Na-Citrat, 78,07mM Zitronensäure, 111,02mM Glucose, mit H₂O_{dest} auf 500ml auffüllen, pH 4,5

Stammlösung für ELISA-Puffer (Grundpuffer, GrPf): 10 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, pH 7,6

Assaypuffer: GrPf, 0,1 % BSA

Ca²⁺-Assaypuffer: GrPf, 0,1 % BSA, 5 mM CaCl₂

EDTA-Assaypuffer: GrPf, 0,1 % BSA, 5 mM EDTA

Waschpuffer: GrPf, 0,05% Tween 20

Ca²⁺-Waschpuffer: GrPf, 0,05% Tween 20, 5mM CaCl₂

EDTA-Waschpuffer: GrPf, 0,05% Tween 20, 5mM EDTA

Coatingpuffer für Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin: 1,59g Na₂CO₃ (30 mM), 8,4g NaHCO₃ (200 mM), mit H₂Odest auffüllen, pH 9,0

Waschpuffer für Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin: PBS 0,05% Tween 20, 3 mM MgCl₂, pH 7,4

Blockpuffer für Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin: PBS, 0,05% Tween20, 2% BSA, pH 7,4

BioSciences: DPBS, pH 7,4

Lagerungspuffer für Antikörper: DPBS, 4mM Natriumazid (NaN₃), 0,4% BSA (für biotinylierte Antikörper)

Blockpuffer für den ELISA: GrPf, 0,05% Tween 20, 2% BSA

Blockpuffer für den ELISA PAHFV-S/ PAHFV-S-Biotin/ Streptavidin-HRP: 0,05% Tween 20, 5% Milchpulver

Coatingpuffer für den ELISA SAFV-AP/ SAFV-HRP: 15mM Na₂CO₃, 348,8mM NaHCO₃, 1L H₂Odest, pH 9,6

Blockpuffer für den ELISA SAFV-AP/ SAFV-HRP (PBS-BSA): 0,19mM BSA, 200ml PBS, pH 7,4 auffüllen auf 250ml mit PBS

Waschpuffer für den ELISA SAFV-AP/ SAFV-HRP (PBS-Tween): 1L PBS, 1ml Tween 20, pH 7,4, 4°C

Sample Diluent (HBS-BSA-T20) für den ELISA SAFV-AP/ SAFV-HRP: 5,95g HEPES, 125mM NaCl, 0,19mM BSA, 200ml H₂Odest, 0,25ml Tween 20, pH 7,2, Auffüllen auf 250ml mit H₂Odest

PBS für den ELISA SAFV-AP/ SAFV-HRP: 136,9mM NaCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄, 2,68mM KCl, 1L H₂O, pH 7,4

2.1.3 Verwendete Reagenzien

Merck KGaA: Triton-X-100

Sigma-Aldrich Chemie GmbH: BSA, Tween 20, EDTA, Milchpulver, Anti-sheep IgG (Fc-specific), highly cross absorbed Peroxidase antibody produced in rabbit

The Medicines Company: Bivalirudin

Haematologic Technologies, Inc.: AHV-5101, AHV-5102, AHV-5112, AHV-5146, FV 200, 2,1, 3,3, FVa 200, Sheep Anti-Human FV (PAHFV-S)

Fisher Scientific GmbH: Biotin (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weight Format), Streptavidin-HRP

Siemens Healthcare GmbH: Humanes Standardplasma, FV-Mangelplasma, Natriumazid, Streptavidin, Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins-HRP

Roche Deutschland Holding GmbH: BM-Chemilumineszenz-ELISA-Substrat (POD)

Affinity Biologicals, Inc.: Sheep anti-Human FV, affinity purified IgG (SAFV-AP), Sheep anti-Human FV, IgG-peroxidase conjugate SAFV-HRP

2.1.4 Verwendete Geräte und Materialien

Greiner Bio One International GmbH: 15ml Tubes, 50ml Tubes

Memmert GmbH + Co. KG: Wasserbad

Sarstedt AG & Co. KG: Neutralmonovetten/ S-Monovette 9 ml, EDTA-Röhrchen

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH: Centrifuge 5804, Pipetten, Pipettenspitzen

Unity Lab Services: Megafuge Zentrifuge mit Ausschwingrotor

Carl Roth GmbH + Co. KG: Tischzentrifuge

Ratiolab GmbH: 2ml Einwegpipetten, Röhrchen

Sysmex Deutschland GmbH: Sysmex-Counter XN-1000, Zellstoff

Geneo Bio TechProducts GmbH / Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH:
1,5 und 2ml Eppendorfcups

OHAUS Europe GmbH: Waage Pioneer TM, Magnetrührer

Schott AG: 500 und 1000ml Glasgefäße, Becher, Messbecher

Mettler-Toledo GmbH: pH-Meter

Cenco-Instrumenten: Vortexgerät

Fisher Scientific GmbH: Säulen: Zeba Spin Desalting Columns (0,5ml) (Thermo #89882), Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte weiß

Peqlab Biotechnologie GmbH: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

Molecular Devices LLC. / ForteBio: Streptavidin-Biosensoren, BLItz System

Corning Incorporated/ Axygen Inc.: PlateMax Axysel Sealing Film

BioTek Instruments, Inc.: Elx50 Microplate Strip Washer, Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, Eppihalter, dunkle Box

Liebherr: Kühlschrank 4°C, -20°C, -80°C

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Thrombozyten-Lysaten

Zur Gewinnung der Lysate wurde den Probanden Blut abgenommen und in einer Neutral-Monovette (S-Monovette 9 ml) aufgefangen, die mit 1,6 ml ACD-Puffer befüllt war. Um bis zur weiteren Verarbeitung im Labor Gerinnungsprozesse zu minimieren, wurden die befüllten Probenröhrchen manuell langsam invertiert. Für die weiteren Schritte der Herstellung wurde in der Zwischenzeit der bei -20°C eingefrorene Suspensionspuffer und Waschpuffer im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Das ACD-Blut wurde zunächst zwei Minuten bei $1550\times g$ zentrifugiert mit der Centrifuge 5804 von Eppendorf (Programm 1). Der sichtbare Plasmaüberstand wurde mit einem Abstand von ca. 3mm zur darunterliegenden Zentrifugatschicht, also der festen Bestandteile, direkt vorsichtig abpipettiert und in einem Röhrchen aufgefangen. Aus diesem Überstand (Plättchenreiches Plasma (PRP)) wurde initial eine Thrombozytenkonzentrationsbestimmung mit dem Sysmex-Counter XN-1000 durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Herstellung der Thrombozytensuspension. Hierfür wurde das Plättchenreiche Plasma fünf Minuten bei $998\times g$ zentrifugiert. Am Boden des Röhrchens bildete sich ein Pellet/Sediment aus Thrombozyten. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Röhrchen auf den Kopf gedreht auf Zellstoff leicht abgeklopft. Es wurden dann mittels 2ml-Einwegpipette 10ml Waschpuffer hinzugegeben und das Pellet darin resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, das Pellet nicht mechanisch zu berühren. Dieser Vorgang der Zentrifugation und Resuspension wurde dreimal wiederholt. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in $600\mu\text{l}$ Suspensionspuffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde dann die abschließende Thrombozytenkonzentration durch den Sysmex-Counter bestimmt. Im letzten Schritt erfolgte die Lyse der Thrombozyten der Suspension. Hierzu wurde $498,75\mu\text{l}$ Thrombozytensuspension $1,25\mu\text{l}$ Triton-X-100 zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Probe zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

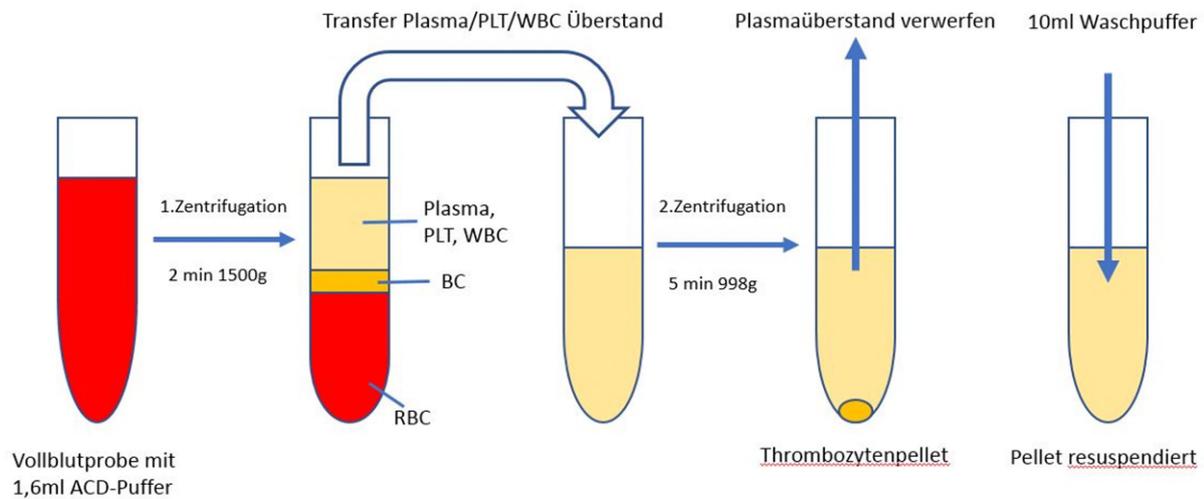


Abbildung 2: Prinzip der Herstellung des plättchenreichen Plasmas für die Gewinnung des Thrombozyten-Lysates

2.2.2 Antikörper Beschreibung und Bindungen

Für die Entwicklung der ELISA-Teste wurden initial die in Tabelle 1 dargestellten Antikörper verwendet (Prolytix, 20.01.2023).

Tabelle 1: Beschreibung der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Isotyp, Typ	Host	Firma
Anti-Human Factor V (AHV-5101)	C-Terminus der 74kDa Light Chain Human FV/FVa	IgG, monoklonal	Mouse	HTI
Anti-Human Factor V (AHV-5146)	Heavy Chain (Fragment D 94kDa) Human Factor V/FVa	IgG, monoklonal	Mouse	HTI
Anti-Human Factor V (AHV-5102)	B-Domäne (Activation Peptide 120.000Da) Human Factor V	IgG, monoklonal	Mouse	HTI

Bezeichnung	Antigen	Isotyp, Typ	Host	Firma
Anti-Human Factor V (AHV-5112)	Light Chain (Fragment E, 74kDa) Human Factor Va	IgG, monoklonal	Mouse	HTI
Sheep anti-Human Factor V, affinity purified IgG (SAFV-AP)	Heavy chain: Aminosäuren 500-513 Human Factor V	IgG affinitätsgereinigt, polyklonal	Sheep	Affinity Biologicals
Sheep anti-Human Factor V, IgG-peroxidase conjugate (SAFV-HRP)	Human Factor V	IgG peroxidasekonjugiert, polyklonal	Sheep	Affinity Biologicals
Sheep anti-Human Factor V (PAHFV-S)	Human Factor V	polyklonal	Sheep	HTI
Rabbit anti-sheep HRP	Sheep	IgG, polyklonal	Rabbit	Life Technologies GmbH

2.2.3 Aufreinigung der Antikörper

Die Konzentration der Antikörper wurden auf 1mg/ml gebracht, durch Zugabe von DPBS (pH 7,4) auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l. Die für die Aufreinigung benötigten Chromatographie-Säulchen (Zeba Spin Desalting Columns (0,5ml)) wurden vorbereitet indem der Verschluss unten abgebrochen und der Deckel angeöffnet wurde. Dann wurden diese in ein 2 ml Eppendorfcup ohne Deckel gesteckt und bei 1500xg in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor für eine Minute bei RT zentrifugiert, um den enthaltenen Lagerungspuffer zu entfernen. Das Säulchen wurde dann in ein neues leeres 2 ml Eppendorfcup gesetzt, und anschließend vorsichtig 300 μ l DPBS auf die Mitte des Gels pipettiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1500xg. Dieser Ablauf wurde zweimal wiederholt. Zur Antikörperaufreinigung wurde das Säulchen in ein 1,5ml Eppendorfcup gesetzt und 100 μ l der vorbereiteten Antikörperlösung (1 mg/ml) auf die Mitte des Gels pipettiert. Es erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 1500g.

2.2.4 Biotinylierung der Antikörper

Zur Vorbereitung der Biotinylierung wurde zu einem Biotin vial (1mg, MW= 829,98) 200 μ l Aqua dest gegeben (ergibt 9nmol/ μ l) und das Biotin unter auf- und abpipettieren aufgelöst.

Dann wurde zu der zuvor aufgereinigten Antikörperlösung (1mg/ml, 100µg in 100µl) 3,7 µl der Biotinlösung unverzüglich hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer lichtgeschützten Box. Alle 15 Minuten wurde die Lösung derweil durchgemischt. Abschließend wurde die Antikörperlösung wie unter Punkt 3.3 erneut gereinigt um das überschüssige Biotin zu entfernen. Aufbewahrt wurden die Antikörper in Lagerungspuffer bei 4°C lichtgeschützt im Kühlschrank.

2.2.5 Überprüfung der Antikörperkonzentration nach Aufreinigung und Biotinylierung mittels NanoDrop

Um zu überprüfen, ob die Ausgangskonzentration der Antikörperlösung vor und nach Aufreinigung und Biotinylierung beibehalten wurde, wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer die Konzentration bei 280nm gemessen (OD_{280nm}, Extinktionskoeffizient 1,4). Die Messung wird über die Einstellung „Protein A280“ durchgeführt. Hierzu wurde das Gerät zunächst mit Aqua dest nullkalibriert. 2 µl Wasser wurden dazu auf den Probenhalter pipettiert, der Messarm des Gerätes heruntergeklappt und eine „Blank“ Messung durchgeführt. Bevor die Antikörperlösung gemessen wurde erfolgte eine weitere „Blank“ Messung. Nun wurden 2µl des reinen Puffers, in dem der Antikörper gelöst war, auf den Probenhalter pipettiert und gemessen. Dies diente dem Ausschluss einer fehlerhaften Konzentrationsmessung durch Störung der optischen Messung durch Bestandteile des Puffers. Dann erfolgte die Messung der Antikörperkonzentration der Antikörperlösung. 2µl der Probe wurden aufpipettiert und eine Messung über „Measure“ durchgeführt.

2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) - Einleitung

Das Enzyme-linked Immunosorbant Assay, kurz ELISA, ist ein immunologisches, Antikörper-basiertes Verfahren zum Nachweis von Molekülen (Cell Signaling Technology, 18.03.2022; DocCheck Medical Services GmbH, 18.03.2022; Wikipedia, 2022). Es kann als quantitativer und qualitativer Test eingesetzt werden, um ein Protein von Interesse zu binden und zu messen. Die Messung erfolgt dabei über eine enzymatische Reaktion, welche durch Bindung von einem Substrat an ein Enzym ausgelöst wird und für eine Farbreaktion sorgt. Dabei lassen sich Proteinmengen von unter einem ng nachweisen (Berg et al., 2013b). Das Verfahren wurde in dieser Form 1971 von den Arbeitsgruppen um Peter

Perlmann und Eva Engvall an der Universität Stockholm und um Anton Schuurs und Bauke van Weemen in den Niederlanden etabliert (Engvall, 2005; Lequin, 2005). Das Prinzip des ELISA ist trotz verschiedener Varianten gleich: Das gewünschte Antigen wird auf der Oberfläche der Well-Platte fixiert. Verwendet werden 96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol. Dann wird ein Antikörper darauf gegeben, welcher das Antigen möglichst spezifisch bindet. Um die Bindung, und somit das Antigen nachzuweisen, wird an diesen Antikörper ein Enzym kovalent gekoppelt (Berg et al., 2013a). Im letzten Schritt wird ein Substrat hinzugegeben, welches mit dem Enzym reagiert und eine Farbreaktion, Fluoreszenz oder Lumineszenz auslöst. Diese kann dann durch ein entsprechendes Lesegerät detektiert werden. Es können sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper eingesetzt werden. Vor allem in Sandwich-ELISAs sind monoklonale Antikörper gut geeignet. Die Signalstärke ist die mit dem Lesegerät detektierte Funktion der Antigenkonzentration (Wikipedia, 2022). Zur Detektion wird in den hier angewendeten Versuchen ein chemilumineszierendes Substrat verwendet. Es kann auch Biotin an den Detektionsantikörper gebunden werden, welcher dann über ein Streptavidin-Konjugat für eine Signalverstärkung sorgt (Wikipedia, 2022).

2.2.7 Direkter ELISA

Bei einem direkten ELISA wird das Antigen direkt an der Mikrotiterplatte fixiert, das gesuchte Protein bindet passiv. Dann wird ein Blockreagenz hinzugegeben, welches vom Antigen unbesetzte Stellen belegt, um unspezifische Bindungen des folgenden Antikörpers zu verhindern. Zum Prinzip des direkten ELISA gehört nun, dass im nächsten Schritt der Antigen-spezifische Antikörper zugegeben wird. Dieser ist hier bereits direkt an ein Enzym konjugiert. Im letzten Schritt wird das Substrat zugegeben, welches die Farbreaktion auslöst. Bei den durchgeführten direkten ELISA wurde Faktor V direkt an der Mikrotiterplatte fixiert. Hierzu wurde Faktor V in der Konzentration von 5 µg/ml unter Verwendung des Coatingpuffers für die Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin direkt auf die Platte gegeben. Zum Blocken wurde der Blockpuffer für den ELISA verwendet. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der überschüssige Puffer abgesaugt. Von jedem der Antikörper wurden pro Well 100 µl hinzugegeben. Für jeden Antikörper wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, sodass jeweils die Konzentrationen 1/0,5/0,25 und 0,125 µg/ml auf die Platte gegeben wurde. Als Assaypuffer wurde

der Ca^{2+} -Assaypuffer verwendet. Um Leerwerte zu erhalten, wurden die Antikörper zudem auch in Wells pipettiert, in denen nur Coatingpuffer ohne Faktor V zugegeben worden war. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte mit dem Ca^{2+} -Waschpuffer gewaschen. Als sekundärer Detektionsantikörper wurde der Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin HRP verwendet. Nach einstündiger Inkubation und nach erneutem Waschen wurde BM-Chemilumineszenz-ELISA-Substrat (POD) hinzugegeben und mit dem Microplate Reader die Messung gestartet.

2.2.8 Indirekter ELISA

Auch bei einem indirekten ELISA wird das Antigen direkt an der Mikrotiterplatte fixiert. Nach der Zugabe des Blockreagenz wird wieder der Antigen-spezifische Antikörper hinzugefügt. Dieser ist jedoch noch nicht mit einem Enzym gekoppelt. Durch Waschen wird dann überschüssiger Antikörper entfernt. Der indirekte Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt nun über einen zweiten Antikörper, welcher an ein Enzym konjugiert ist und an den ersten bindet. Auch hier wird im letzten Schritt das Substrat hinzugefügt.

2.2.9 Sandwich-ELISA

Im Unterschied zu den beiden zuvor beschriebenen Verfahren bindet das Antigen nicht primär an die Mikrotiterplatte. In einem ersten Schritt wird ein erster Antikörper an die Platte adsorbiert und fixiert. Auch hier wird im zweiten Schritt Blockreagenz zugegeben. Jetzt wird die Probe mit dem Antigen hinzugefügt, welches spezifisch an den Antikörper, also nicht an die Platte, bindet. Dieser Antikörper stellt den Fängerantikörper dar. Dann wird ein zweiter Antikörper, welcher an einem anderen Epitop des Antigens binden muss als der erste, hinzugegeben. Dieser Detektionsantikörper kann wie oben beschrieben direkt an ein Enzym konjugiert sein oder noch einen weiteren Antikörper binden, welcher ein Enzym trägt (Cell Signaling Technology, 18.03.2022).

2.2.10 Beschichten der ELISA-Platten

Wie oben beschrieben werden bei dem ELISA in einzelnen Schritten nacheinander die Komponenten des ELISA in Lösung auf die Mikrotiterplatte gebracht, damit sie aneinanderbinden. Im ersten Schritt wird ein Antikörper direkt an die Platte gebunden. Hierfür wird zunächst der für den speziellen ELISA spezifische Lösungspuffer bzw. Beschichtungspuf-

fer für den entsprechenden Antikörper angesetzt. Der Antikörper wird dann in einer bestimmten Verdünnung in diesem Puffer gelöst. In jedes verwendete Well/ Vertiefung der Platte werden 100 µl der Lösung pipettiert. In diesem Zustand inkubiert die beschichtete Platte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank, um am nächsten Tag mit den weiteren Schritten des ELISA fortzufahren. Das Prinzip des Beschichtens gilt für alle verwendeten Antikörper. Neben der Beschichtung der Platte direkt mit einem der Antikörper, die das Antigen spezifisch binden, kann die Platte auch mit anderen Proteinen beschichtet werden, an welche dann in den weiteren Arbeitsschritten der Antikörper bindet. Hier wird unter anderem die Platte mit 10 µg/ml BSA-Biotin beschichtet. Dazu werden 250 µl einer 2 mg/ml BSA-Biotin-Lösung in 50 ml Coating-Puffer für die Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin gelöst. 100 µl werden in jedes Well/ Vertiefung pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation werden die Wells mit Waschpuffer für die Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin mit dem Elx50 Microplate Strip Washer dreimal gewaschen. Dann werden 100 µg/ml Streptavidin (500µl einer 1 mg/ml-Lösung in 50 ml Aptamerpuffer gelöst) hinzugefügt. Streptavidin bindet das Biotin in einem maximalen Verhältnis von 1:4. Nach zweistündiger Inkubationszeit wird wieder 3mal gewaschen. Im letzten Schritt wird pro Well 200µl Blockpuffer für die Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin hinzugegeben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit wird die Platte abgesaugt und bei -20°C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.11 Bio-Layer Interferometrie

Mit dieser Methode lassen sich einzelne Molekülbindungen und biomolekulare Interaktionen messen, wie Protein-Protein-Interaktionen. Dafür wurde vor und nach der Bindung der Brechungsindex ermittelt. Bei einer stattgefundenen Bindung änderte sich der Index (Wikipedia,2023). Verwendet wurde das BLitz R System. Ein Streptavidin-beschichteter Biosensor wurde vor die Lichtquelle aufgesetzt. Zunächst wurde ein erster Ligand (Antikörper oder Antigen) auf diesem Sensor gebunden und immobilisiert. Die darauffolgende Bindung der Probe (Antigen oder Antikörper) in Lösung produzierte einen Anstieg der optischen Dicke an der Sensorspitze. Dies sorgte für eine Wellenlängenverschiebung und stellte eine direkte Messung der Dickenänderung der biologischen Schicht auf dem Sen-

sor dar. Das Gerät analysierte das Interferenzmuster von weißem Licht mit einem Spektrometer, welches an zwei Oberflächen reflektiert wird. Eine Reflektion fand an einer inneren Schicht des Sensors statt, und die zweite an der Schicht des immobilisierten Proteins auf der Sensorspitze. Jede Änderung der Zahl der gebundenen Moleküle verursachte eine Verschiebung des Interferenzmusters. Da der Sensor Streptavidin-beschichtet ist, wurde der zu immobilisierende Antikörper vorbereitend biotinyliert, damit eine Bindung stattfinden konnte.

Angewandte Messprotokolle

Über den Experimenttyp „Advanced kinetics“ ließ sich im Versuchsverlauf das kinetische Bindungsprofil der Proteine auf dem Sensor beobachten. Bevor der Versuch gestartet wurde, mussten alle beteiligten Proteine und Lösungen vorbereitet werden. Benötigt wurde Assaypuffer als Lösungsmedium für die Proteine und als Leerwert für die Messung. Das biotinylierte Protein und die anderen Proteine wurden verdünnt in diesem Assaypuffer auf die gewünschte Konzentration gebracht. Der Biosensor wurde 10 Minuten in Assaypuffer getaucht und dann auf das Gerät aufgesteckt. Zwei Wells wurden mit Assaypuffer befüllt. Nach der Installierung des Biosensors wurde das passende Assay im Programm ausgewählt. Nacheinander wurden die Versuchsabschnitte „Baseline“ (30 Sekunden) für den Leerwert, „Loading“ (90 Sekunden) für die Bindung des ersten, biotinylierten Proteins, eine erneute Baseline (30 Sekunden), „Association“ (90 Sekunden) für jedes weitere zu bindende Protein mit jeweils einer Baseline dazwischen, und „Dissociation“ (90 Sekunden) für die am Ende folgende Dissoziation, festgelegt. Für die Schritte „Baseline“ und „Dissociation“ tauchte der Sensor in ein Well mit Assaypuffer. Für die Schritte „Loading“ und „Association“ tauchte der Sensor in einen 4 µl Tropfen Probe der Proteinlösung in einem Probenhalter. Die zwischengeschobenen Baselines dienen dem Herauswaschen von nicht gebundenem Protein, da nur gebundenes Protein vom Gerät detektiert wurde (Shah und Duncan, 2014). Diese Methode diente der Optimierung der ELISA. Im ELISA ließ sich durch das entstehende Signal feststellen, ob alle Komponenten gebunden worden sind oder nicht. Durch die Bio-Layer Interferometrie ließen sich einzelne Molekülbindungen, also der einzelnen Komponenten der ELISAs, betrachten und analysieren

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Testetablierung

3.1.1 Testung der monoklonalen Antikörper im direkten ELISA und mit Biolayer-Interferometrie

Ziel dieser Versuche war herauszufinden, ob sich die monoklonalen Antikörper (AHV-5101, AHV-5102, AHV-5112 und AHV-5146) für die Entwicklung eines ELISA eignen, indem man sie in der Rolle des Fänger- und des Detektionsantikörpers anwendet.

Im ersten Versuch wurde ein direkter ELISA angewendet. Konkret wurde Faktor V in der Konzentration 5 µg/ml direkt auf einer Mikrotiterplatte fixiert und die Antikörper jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen (1/0,5/0,25/0,125 µg/ml) zum Detektieren des Faktor V hinzugegeben (siehe Methoden 2.2.7). Als sekundärer Detektionsantikörper wurde der Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin HRP verwendet. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates wurden mit dem Microplate Reader die Signalstärken ermittelt.

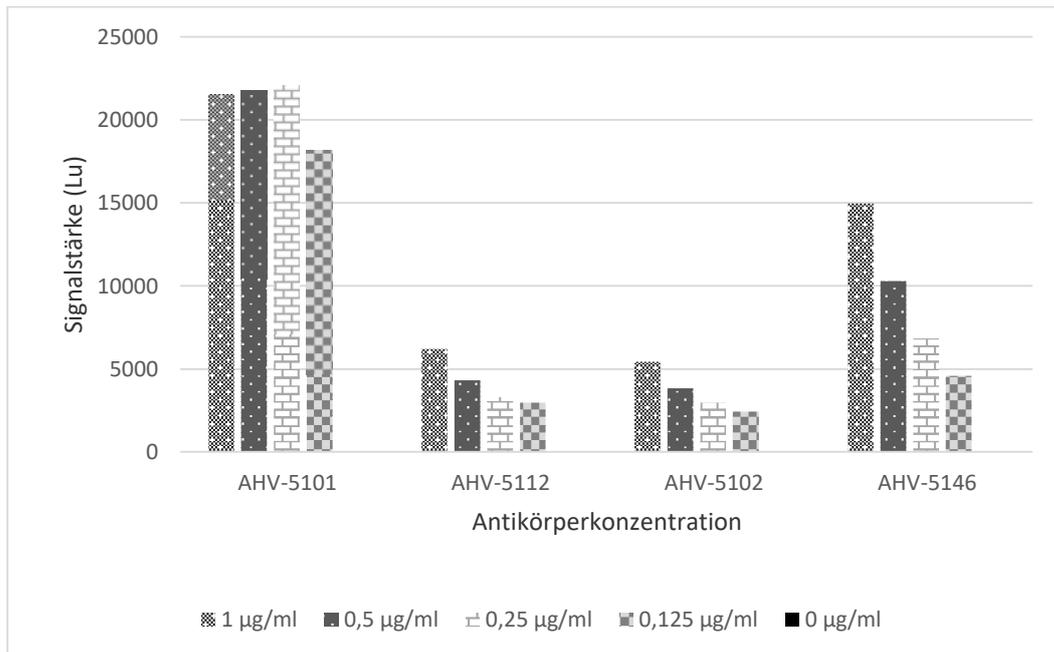


Abbildung 3: Messergebnisse der direkten ELISA unter Verwendung der vier monoklonalen Antikörper. Faktor V wurde in der Konzentration 5 µg/ml auf die Platte gegeben. Für jeden Antikörpereinsatz wurden jeweils die Konzentrationen 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/ml verwendet

In Abbildung 3 sind die Messergebnisse der vier verwendeten Antikörper im ELISA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zum Leerwert, bei dem kein Faktor V an die Platte gekoppelt war, bei allen Antikörpern Bindungen an Faktor V stattfanden. Deutlich wird, dass bei gleicher Antikörperkonzentration der ELISA, in welchem der Antikörper AHV-5101 verwendet wurde, die höchste Signalstärke hervorruft. Ein Verdünnungseffekt lässt sich bei diesem in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht feststellen. Bei den drei anderen Antikörpern sieht man dagegen wie die Signalstärke mit Zunahme der Antikörperverdünnung abnimmt. Unter diesen drei ELISA zeigte der, in welchem der Antikörper AHV-5146 verwendet wurde, die höchsten Signalstärken. Die Verwendung von AHV-5112 und AHV-5102 unterscheiden sich in Bezug auf die erreichten Signalstärken nur marginal.

Im nächsten Schritt wurden die Bindungen der Antikörper an Faktor V und an Faktor Va mittels Biolayer-Interferometrie untersucht. Das Ziel war zu überprüfen, welche Bindungsfähigkeiten die einzelnen Antikörper spezifisch für Faktor V und Faktor Va besitzen und wie sich diese unterscheiden.

Hierfür wurden zunächst die biotinylierten Antikörper (1 μM) auf den Sensor geladen. Dann wurden jeweils Faktor V (0,6 μM) bzw. Faktor Va (1,19 μM) auf den Sensor geladen. Als Assaypuffer wurde für jeden Schritt des Versuchsdurchlaufes der Ca^{2+} -Assaypuffer verwendet, da Ca^{2+} als Bindeglied der leichten und schweren Kette die strukturelle Integrität des Faktor Va gewährleisten sollte.

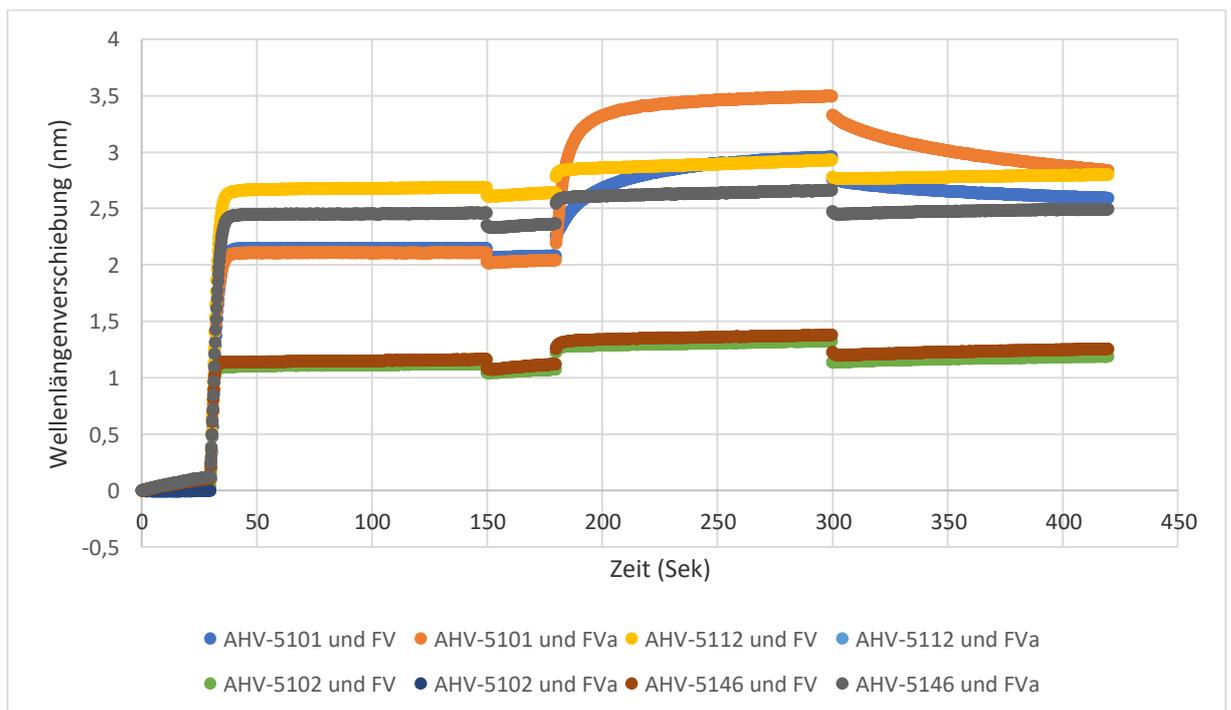


Abbildung 4: Biolayer-Interferometrie mit monoklonalen Antikörpern und Faktor V/ Faktor Va

Der erste Anstieg der jeweiligen Kurven ab Sekunde 30 stellt die erfolgreiche Bindung des jeweiligen Antikörpers an den Sensor dar. Ab Sekunde 150 folgt eine etwas nach unten versetzte horizontale Baseline. Der zweite darauffolgende Anstieg ab Sekunde 180 stellt die Bindung von Faktor V bzw. Faktor Va dar, welcher nur bei zweien der Durchläufe (Run

1 und Run 2) als erfolgreicher Anstieg bzw. Bindung gewertet werden kann. Der abschließende Abfall der Linien ab etwa Sekunde 300 stellt die Dissoziation des Faktor V bzw. Faktor Va vom Sensor dar

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, konnten alle Antikörper in einem ersten Schritt erfolgreich an den Sensor gebunden werden. Im Rahmen der Überprüfung der Bindung von Faktor V bzw. Faktor Va an die immobilisierten Antikörper war lediglich die Bindung an AHV-5101 als erfolgreich zu werten. Die anderen Antikörper zeigten keine Bindung an Faktor V oder Faktor Va.

Als Zwischenfazit der Versuche ließ sich festhalten, dass der Antikörper AHV-5101 die besten Bindungsfähigkeiten im ELISA auf der Mikrotiterplatte und bei der Biolayer-Interferometrie zeigt. Die anderen Antikörper konnten bei dieser keine Bindung zu Faktor V bilden, im ELISA jedoch schien eine Bindung an den an die Platte fixierten Faktor V möglich zu sein.

Nun wurde ein erster Sandwich-ELISA aufgebaut. Hierfür wurden jeweils der AHV-5101 und der AHV-5112 in der Konzentration 5 µg/ml an die Mikrotiterplatte mit dem Coatingpuffer für Beschichtung der ELISA-Platte mit BSA-Biotin, Streptavidin fixiert und über Nacht inkubiert. Nach dem Blocken mit dem Blockpuffer für den ELISA wurden jeweils Faktor V und Faktor Va in einer Verdünnungsreihe (1000 pM/100 pM/10 pM/0 pM) in oben beschriebenem Assaypuffer hinzugegeben. Als Detektionsantikörper wurde biotinylierter AHV-5112 für die mit AHV-5101 beschichteten Wells und biotinylierter AHV-5101 für die mit AHV-5112 beschichteten Wells in der Konzentration 1 µg/ml verwendet. Als sekundärer Detektionsantikörper diente Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:1250. Als Waschpuffer diente der Ca²⁺-Waschpuffer.

Ergebnis dieses Versuchs war, dass in keiner ELISA-Variante eine Bindung erfolgte. Da der AHV-5112 bereits im Biolayer-Versuch keine Bindung zeigte, der AHV-5101 jedoch als Fängerantikörper sehr gut funktionierte, wurde entschieden den AHV-5112 nicht weiter zu verwenden und die weiteren ELISA mit dem AHV-5101 weiterzuentwickeln.

Nach dem gleichen Prinzip wurde ein Sandwich-ELISA aufgebaut, in welchem nur der biotinylierte AHV-5112 durch den biotinylierten AHV-5146 in der Konzentration 1 µg/ml ersetzt wurde als Detektionsantikörper. Als Fängerantikörper wurde wieder der AHV-5101 verwendet.

Auch in dieser Konstellation erfolgte keine Bindung. Da der Sandwich-ELISA keine Bindung zeigte und der AHV-5146 auch im Biolayer-Versuch keine Bindung zu Faktor V einging, wurde deutlich, dass er für diesen Aufbau im Sandwich-ELISA ebenfalls nicht geeignet war. Nur im direkten ELISA konnte der Antikörper den direkt an die Platte fixierten Faktor V binden. Weitere Versuche, den AHV-5146 in einen Sandwich-ELISA einzubinden, indem die Konzentrationen variiert wurden und indem man zum Faktor V Harnstoff hinzugegeben hat um mögliche nicht zugängliche Bindungsstellen durch Entfaltung freizugeben, blieben erfolglos.

Somit zeigten diese Vorversuche, dass lediglich der monoklonale Antikörper AHV-5101 für den Aufbau von ELISA-Testen geeignet war. Es wurden im Folgenden auch polyklonale Antikörper eingesetzt, um verschiedene ELISA-Varianten aufzubauen. Der Aufbau und die optimierten Protokolle der letztlich etablierten Assays wird nachfolgend dargestellt.

3.1.2 Aufbau und Optimierung der in der Studie eingesetzten ELISA-Verfahren

Die letztlich etablierten ELISA-Verfahren werden in Abbildung 5 dargestellt und nachfolgend erläutert.

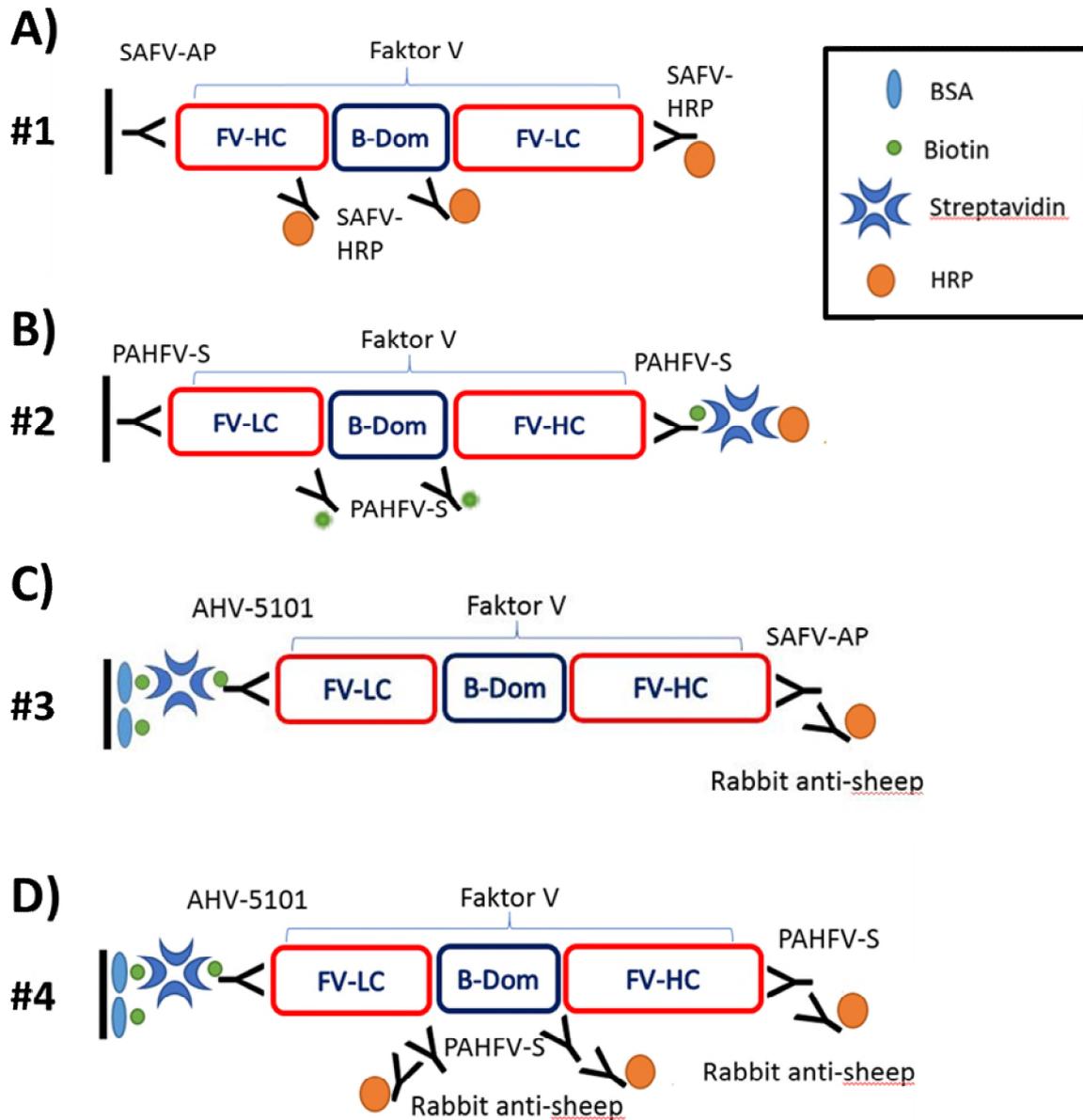


Abbildung 5: Etablierte ELISA-Verfahren

A) Fängerantikörper SAFV-AP und Detektionsantikörper SAFV-HRP (ELISA #1). B) Fängerantikörper PAHFV-S und Detektionsantikörper PAHFV-S in biotinylierter Form (ELISA #2). C) Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP (ELISA #3). D) Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S (ELISA #4)

Als Fängerantikörper wird im **ELISA #1** der affinitätsgereinigte, polyklone Antikörper SAFV-AP verwendet, der an der schweren Kette von FV im Bereich der Aminosäuren 500-513 bindet. Der polyklonale, HRP-markierte Detektionsantikörper bindet an unterschiedlichen, nicht definierten Stellen des FV (Abb. 5A).

Im **ELISA #2** dient der polyklonale, gegen FV gerichtete Antikörper PAHFV-S sowohl als Fänger, als auch als Detektionsantikörper. Zur Detektion wurde PAHFV-S in biotinylierter Form verwendet, wobei Streptavidin-HRP zur Signalgenerierung zum Einsatz kam (Abb. 5B).

In **ELISA #3** und **ELISA #4** wurde der monoklonalen Mouse-Anti human Factor V Antikörper (AHV-5101) in biotinylierter Form als Fängerantikörper verwendet. Als Detektionsantikörper kamen im ELISA 3 der affinitätsgereinigte SAFV-AP, im ELISA #4 der PAHFV-S zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden Fällen ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper genutzt (Abb. 5C und 5D).

Die Verdünnungsreihe von humanem Standardplasma diente als Referenz/ Standardkurve für die Plasmaproben. Hierfür wurde zunächst das humane Standardplasma linear in Faktor-V-Mangelplasma verdünnt, wobei die erste Stufe reines Standardplasma und die letzte Stufe als Leerwert nur Mangelplasma enthielt. Die Verdünnungsreihe von Faktor V diente als Referenz/ Standardkurve für die Lysate.

In der nachfolgenden Tabelle 2 werden die letztlich optimierten Verfahrensschritte der vier ELISA-Verfahren zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Darstellung der Durchführung der vier ELISA-Varianten

Arbeitsschritt	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3 und 4
Verwendung einer vorbeschichteten Platte			BSA-Biotin und Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte
Coating des Fängerantikörpers	SAFV-AP in Coatingpuffer Verdünnung 1:100, 100 µl/Well	PAHFV-S mit 20 µg/ml in Coatingpuffer 100 µl/Well	biotinylierter AHV-5101: 0,25 µg/ml in Assaypuffer, 100 µl/Well

Arbeitsschritt	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3 und 4
Inkubation	Über Nacht bei 4°C	Über Nacht bei 4°C	60 min bei RT lichtgeschützt
Waschen/Absaugen	Absaugen des überschüssigen Puffers (Microplate Washer)	3x (Microplate Washer) mit Waschpuffer	3x (Microplate Washer) mit Waschpuffer
Blocken	Blockpuffer (PBS-BSA), 150 µl/Well	Blockpuffer, 200 µl/Well	
Inkubation	90 min bei RT lichtgeschützt	120 min bei RT lichtgeschützt	
Waschen/Absaugen	3x (Microplate Washer) mit Waschpuffer	Absaugen des überschüssigen Puffers (Microplate Washer)	
Proben auftragen	<p>1. Verdünnungsreihe humanes Standardplasma, dazu erst SP linear in Mangelplasma verdünnt, diese Proben dann je 1:200 in Sample Diluent (HBS-BSA-T20)</p> <p>2. Verdünnungsreihe Faktor V ab 1000 pM halblogarithmisch in Sample Diluent (HBS-BSA-T20)</p> <p>3. Lysatproben 1:5 in Sample Diluent (HBS-BSA-T20)</p> <p>4. Plasmaprobe 1:200 in Sample Diluent (HBS-BSA-T20) und vorverdünnt 1:2 in Mangelplasma und dann 1:200 in Sample Diluent</p> <p>Je 100µl/Well</p>	<p>1. Verdünnungsreihe humanes Standardplasma, dazu erst SP linear in Mangelplasma verdünnt, diese Proben dann je 1:50 in Assaypuffer (GrPf plus 5mMEDTA, 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver)</p> <p>2. Verdünnungsreihe Faktor V ab 1000 pM halblogarithmisch in gleichem Assaypuffer</p> <p>3. Lysatproben 1:5 in Assaypuffer</p> <p>4. Plasmaprobe 1:50 in Assaypuffer und vorverdünnt 1:2 in Mangelplasma und dann 1:50 in Assaypuffer</p> <p>Je 100µl/Well</p>	<p>1. Verdünnungsreihe humanes Standardplasma, dazu erst SP linear in Mangelplasma verdünnt, diese Proben dann je 1:50 in Assaypuffer (GrPf plus 5mMEDTA, 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver)</p> <p>2. Verdünnungsreihe Faktor V ab 1000 pM halblogarithmisch in gleichem Assaypuffer</p> <p>3. Lysatproben 1:5 in Assaypuffer</p> <p>4. Plasmaprobe 1:50 in Assaypuffer und vorverdünnt 1:2 in Mangelplasma und dann 1:50 in Assaypuffer</p> <p>Je 100µl/Well</p>
Inkubation	90 min bei RT lichtgeschützt	60 min bei RT lichtgeschützt	60 min bei RT lichtgeschützt
Waschen	1x (manuell), dann 3x (Microplate Washer)	1x (manuell), dann 3x (Microplate Washer)	1x (manuell), dann 3x (Microplate Washer)

Arbeitsschritt	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3 und 4
Detektionsantikörper auftragen	SAFV-HRP 1:100 in Sample Diluent(HBS-BSA-T20) , 100 µl/Well	Biotinylierter PAHFV-S mit 20 µg/ml in Assaypuffer (GrPf plus 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver), 100 µl/Well	ELISA 3: SAFV-AP mit 2,5 µg/ml in Assaypuffer (GrPf plus 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver), 100 µl/Well ELISA 4: PAHFV-S mit 1,25 µg/ml in Assaypuffer (GrPf plus 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver), 100 µl/Well
Inkubation	60 min bei RT lichtgeschützt	60 min bei RT lichtgeschützt	60 min bei RT lichtgeschützt
Waschen	3x (Microplate Washer)	3x (Microplate Washer)	3x (Microplate Washer)
Sekundären Detektionsantikörper auftragen	Streptavidin-HRP 1:1250 in Sample Diluent (HBS-BSA-T20), 100 µl/Well	Streptavidin-HRP 1:1250 in Assaypuffer (GrPf plus 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver), 100 µl/Well	Rabbit anti-sheep-HRP mit 0,25 µg/ml in Assaypuffer (GrPf plus 0,05% Tween 20 und 1% Milchpulver), 100 µl/Well
Inkubation	90 min bei RT lichtgeschützt	30 min bei RT lichtgeschützt	60 min bei RT lichtgeschützt
Waschen	3x (Microplate Washer)	3x (Microplate Washer)	3x (Microplate Washer)

3.1.3 Charakterisierung der gewonnenen Plasmaproben und Thrombozytenlysate

Im Rahmen der Studie konnten von insgesamt 29 Spendern sowohl Plasmaproben als auch Thrombozytenlysate gewonnen werden. Diese Proben wurden durch die im Gerinnungslabor des IHT etablierte Testverfahren wie nachfolgend dargestellt charakterisiert.

3.1.4 Faktor-V Aktivitätsbestimmung der Proben

Von jeder Lysat- und Plasmaprobe des jeweiligen Probanden wurde eine Faktor V Aktivitätsbestimmung durchgeführt.

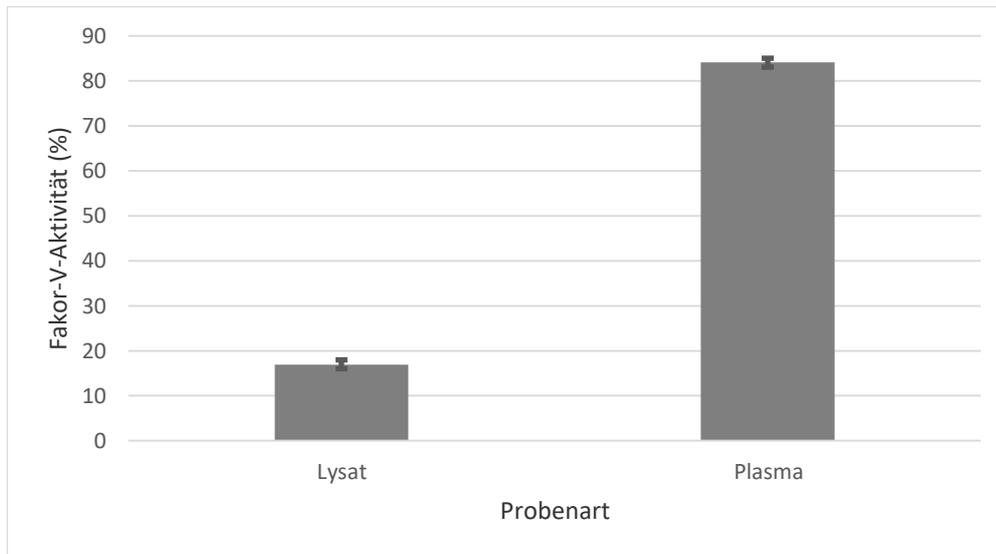


Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Faktor V Aktivität der Lysat- und Plasmaproben

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, wurde bei den Plasmaproben im Mittelwert eine deutlich höhere Aktivität gemessen als bei den Lysatproben.

3.1.5 Thrombozytenzahl der Lysate

Nach der Herstellung der Thrombozytenlysate wurde die Thrombozytenzahl der einzelnen Proben mit einem Blutbilautomaten (Sysmex XN-1000) bestimmt.

Als mittlerer Wert wurde eine Thrombozytenzahl von $435 \times 10^3/\mu\text{l}$ Lysat ermittelt.

3.1.6 Ergebnisse der FV-Bestimmungen in den Plasmaproben mittels der neu entwickelten ELISA-Verfahren

Die gesammelten Plasmaproben wurden auf die zuvor beschriebenen vier verschiedenen entwickelten ELISA zur Messung aufgetragen. Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung der Faktor-V Konzentration im Probandenplasma und der Vergleich der Messfähigkeiten der entwickelten ELISA.

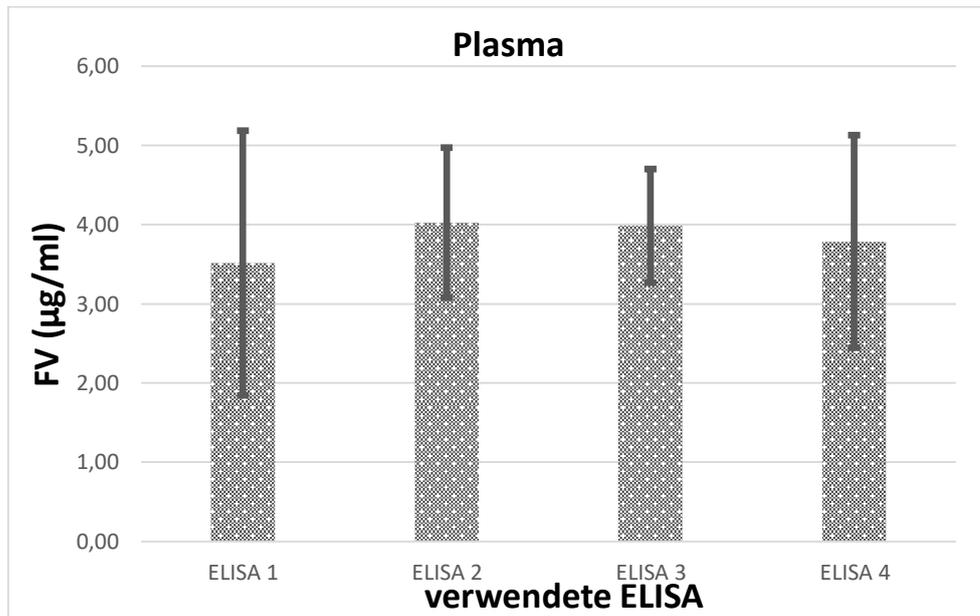


Abbildung 7: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Plasmaprobenkonzentrationen sowie der Standardabweichungen bei der Anwendung in den ELISA 1 bis 4

Wie anhand der Abbildung 7 zu erkennen ist, maßen die vier verschiedenen ELISA bei der Verwendung der gleichen Proben vergleichbare Werte. Die höchsten Werte wurden im Durchschnitt durch ELISA 2 ermittelt (4,02 µg/ml, Standardabweichung 0,95), und die niedrigsten durch ELISA 1 (3,51 µg/ml, Standardabweichung 1,67). Die Messwerte unterschieden sich nur marginal, sie lagen im Mittel unter der allgemein bekannten durchschnittlichen Plasmakonzentration von ca. 7 µg/ml (Tracy et al., 1982). Einige Einzelwerte lagen jedoch in diesem Bereich (Maximalwerte ELISA 1 und ELISA 4).

3.1.7 Ergebnisse der FV-Bestimmungen in den Thrombozytenlysaten mittels ELISA

Die vorbereiteten Lysatproben wurden auf die zuvor beschriebenen vier verschiedenen entwickelten ELISA zur Messung aufgetragen. Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung der Faktor-V Konzentration in den Thrombozytenzelllysaten und der Vergleich der Messfähigkeiten der entwickelten ELISA.

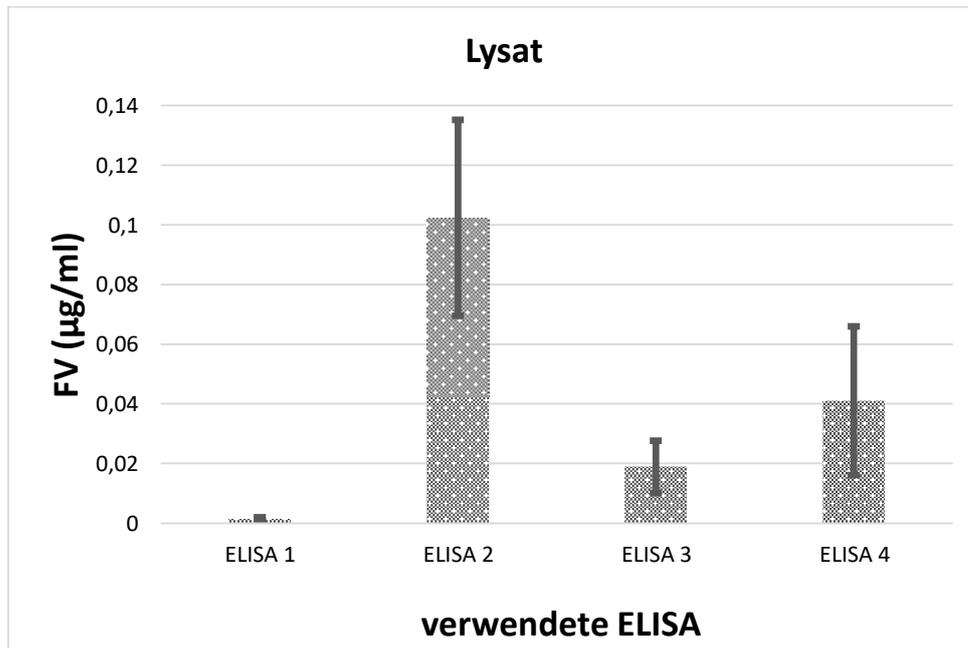


Abbildung 8: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Lysatprobenkonzentrationen sowie der Standardabweichungen bei der Anwendung in den ELISA 1 bis 4

Wie anhand der Abbildung 8 zu erkennen ist, maßen die vier verschiedenen ELISA bei Verwendung der gleichen Proben sehr unterschiedliche Werte. Die höchsten Werte konnten im Durchschnitt mit ELISA 2 ermittelt werden (0,1024, Standardabweichung 0,03290, und die niedrigsten mit ELISA 1 (0,0014 µg/ml, Standardabweichung 0,0006). ELISA 3 und 4 lagen mit ihren durchschnittlichen Messwerten dazwischen. Diese beiden ELISA besitzen den gleichen Aufbau mit dem einzigen Unterschied des anderen Detektionsantikörpers. Die Werte des ELISA 4 lagen im Mittel über denen des ELISA 3. Wie erwartet lagen die Messwerte der Lysatproben unter denen der Plasmaproben.

3.2 Berechnung der Verteilung von Faktor V im gesamten Thrombozytenpool und im Blutplasma

Durch folgende Berechnungen wurde ermittelt, zu welchem Anteil sich Faktor V im Thrombozytenpool und im Plasma befindet.

Faktor V Menge n im Gesamtthrombozytenpool: Berechnung anhand der Konzentrationsmessung mit ELISA 2

Berechnung der Masse m des Faktor V aus der gemessenen Konzentration:

$$m \text{ FV (in Lysatprobe)} = c \cdot V = 0,1024 \text{ } \mu\text{g/ml} \cdot 0,5 \text{ ml} = 0,05 \text{ } \mu\text{g FV im Lysat}$$

Berechnung der Stoffmenge n von Faktor V aus der berechneten Masse m:

$$n \text{ FV (in Lysatprobe)} = m/M = 0,05 \cdot 10^{-6} \text{ g} / 330000 \text{ g/mol} = 1,55 \cdot 10^{-13} \text{ mol FV im Lysat}$$

Berechnung der Molekülzahl von Faktor V im Lysat:

$$1,55 \cdot 10^{-13} \text{ mol FV} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} = 9,34 \cdot 10^{10} \text{ Moleküle FV im Lysat}$$

Thrombozytenzahl (gemessener Mittelwert) im Lysat (0,5ml)

$$= 344 \cdot 10^3 / \mu\text{l} \cdot 500 \mu\text{l} = 172 \cdot 10^3 \text{ Thrombozyten im Lysat}$$

Berechnung Faktor V Molekülanzahl pro Thrompzyt:

$$9,34 \cdot 10^{10} \text{ Moleküle FV} / 172 \cdot 10^3 \text{ Thrombozyten} = 544 \text{ Faktor V Moleküle/ Thrombozyt}$$

Berechnung Faktor V Molekülanzahl im Thrombozytenpool des Körpers bei ca. 6L Blutvolumen und ca. 250000 Thrombozyten im Körper:

$$54 \text{ Moleküle FV/ Thrombozyt} \cdot 250000 \cdot 10^6 / \text{L} \cdot 6 = 8,16 \cdot 10^{14} \text{ Moleküle FV im Thrombozytenpool des Körpers}$$

Faktor V Menge n im Gesamtplasmavolumen des Körpers: Berechnung anhand der Konzentrationsmessung mit ELISA 2

Berechnung der Masse m des Faktor V aus der gemessenen Konzentration:

$$m \text{ FV (im Plasma)} = c \cdot V \cdot \text{Plasmaanteil im Blutvolumen} = 4,02 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{g/L} \cdot 6 \text{ L} \cdot 0,55 = 13266 \text{ } \mu\text{g FV im Plasma}$$

Berechnung der Stoffmenge n von Faktor V aus der berechneten Masse m:

$$n \text{ FV (im Plasma)} = m/M = 13266 \cdot 10^{-6} \text{ g} / 330000 \text{ g/mol} = 4,02 \cdot 10^{-8} \text{ mol FV im Plasma}$$

Berechnung der Molekülzahl Faktor V im Körperplasma:

$$4,02 \cdot 10^{-8} \text{ mol FV} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} = \underline{2,42 \cdot 10^{16} \text{ Moleküle FV im Plasma des Körpers}}$$

Berechnung der Gesamtmolekülzahl Faktor V aus Thrombozytenpool und Plasma:

$$8,16 \cdot 10^{14} + 2,42 \cdot 10^{16} = 2,5 \cdot 10^{16} \text{ Moleküle FV insgesamt}$$

Berechnung der prozentualen Anteile des Faktor V im Thrombozytenpool und im Plasma:

$$8,16 \cdot 10^{14} / 2,50 \cdot 10^{16} = 0,0326 = \mathbf{3,26\%} \text{ FV aus dem Thrombozytenpool}$$

$$2,42 \cdot 10^{16} / 2,50 \cdot 10^{16} = 0,9674 = \mathbf{96,74\%} \text{ FV aus dem Plasma}$$

Nach diesen Berechnungen befänden sich etwa 3,26% des gesamten Faktor V Bestandes in den Thrombozyten gespeichert, und 96,74% frei im Plasma.

3.3 Korrelation Thrombozytenzahl und Faktor V Aktivität in den Thrombozytenlysaten

Durch Anwendung der Pearson-Korrelation und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten r wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl der Probanden und der Faktor V Aktivität der entsprechenden Probe bestand.

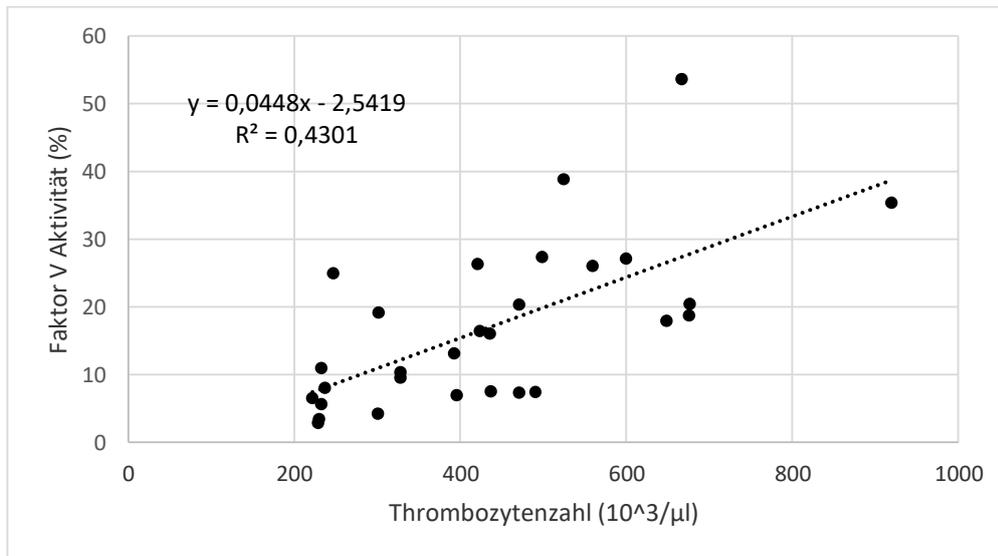


Abbildung 9: Streudiagramm der Einzelwerte von Thrombozytenzahl und entsprechender Faktor V Aktivität in den Lysatproben

Wie Abbildung 9 zeigt, ließ sich eine positiv ansteigende Trendlinie erkennen, welche einen positiven linearen Zusammenhang vermuten ließ. Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,656$. Dies bestätigte die lineare Korrelation. Da der p-Wert 0,00011 betrug, war dieses Ergebnis signifikant.

3.4 Korrelation zwischen der plasmatischen und thrombozytären Faktor V-Aktivität

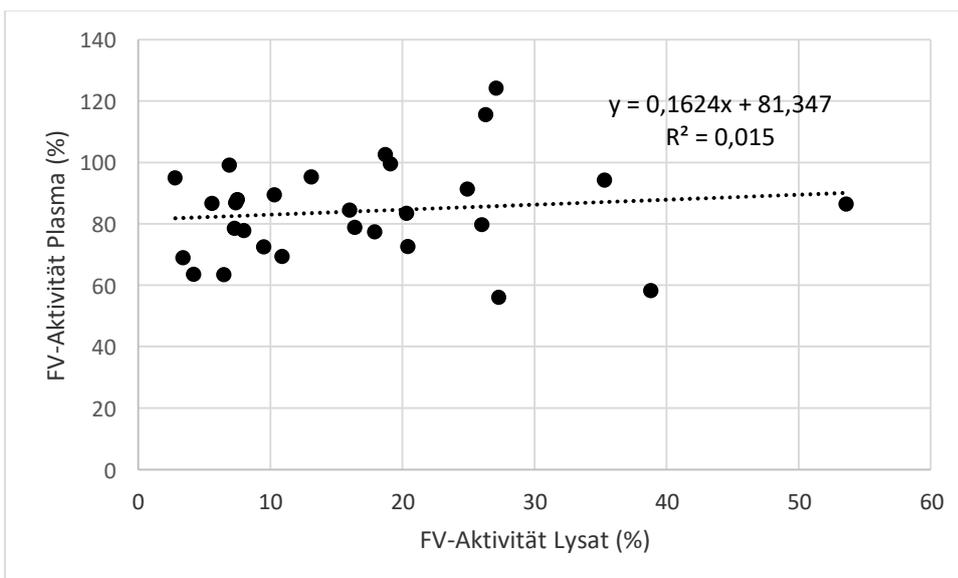


Abbildung 10: Darstellung der Aktivität der FV Proben im Streudiagramm. Aufgetragen sind jeweils Plasma- gegen Lysat-Aktivität der Probanden

Wie in Abbildung 10 zu erkennen, lässt sich eine leicht positiv ansteigende Trendlinie erkennen, welche lediglich einen leicht positiven linearen Zusammenhang vermuten lässt. Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,123$. Dies bestätigt die nur schwache lineare Korrelation. Da der p-Wert 0,527 beträgt, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

3.5 Korrelation der plasmatischen und thrombozytären Faktor V-Aktivität mit den mittels ELISA bestimmten FV-Konzentrationen.

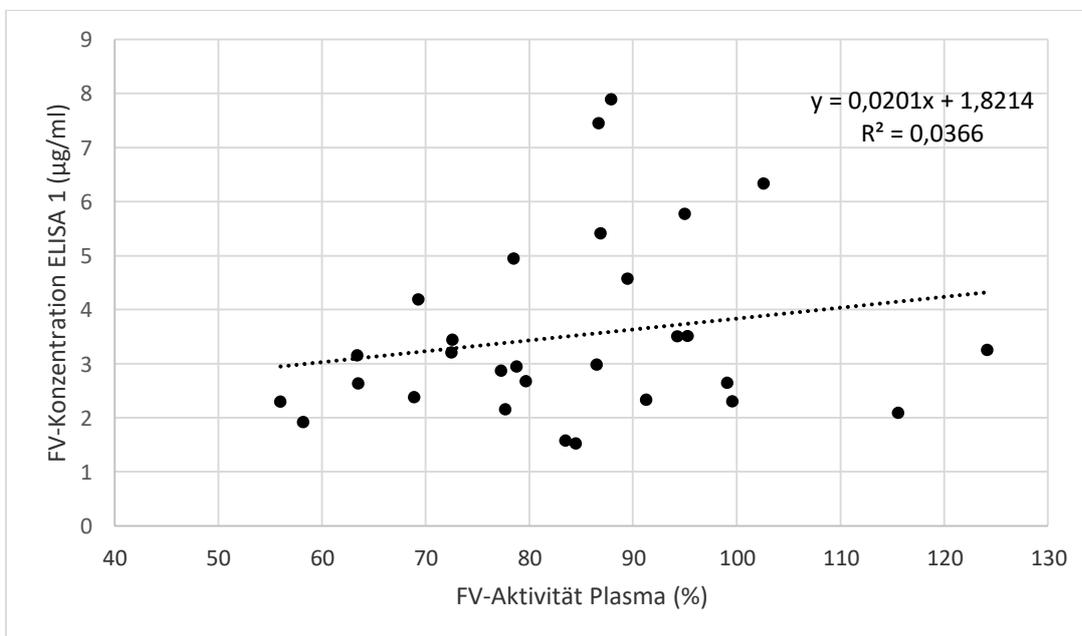


Abbildung 11: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 1 gemessene FV-Konzentration der Proben

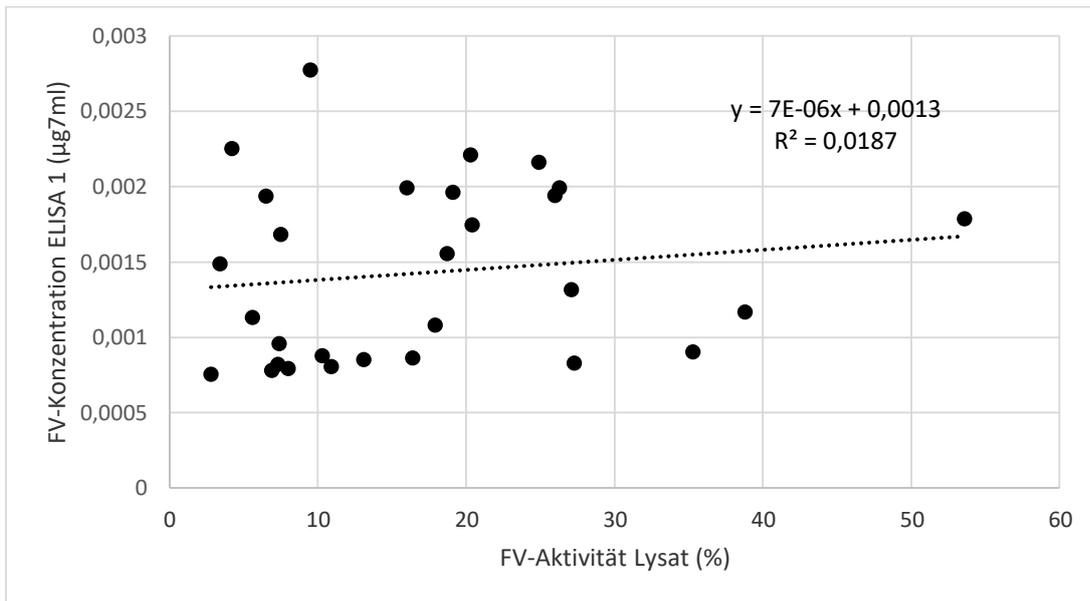


Abbildung 12: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 1 gemessene FV-Konzentration der Proben

Es lassen sich in den Abbildungen 11 und 12 jeweils leicht positiv ansteigende Trendlinien erkennen, welche lediglich einen leicht positiven linearen Zusammenhang vermuten lässt. Der Korrelationskoeffizient betrug für die Plasmamessungen $r=0,191$ und für die Lysatmessungen $r=0,137$. Dies bestätigt die nur schwache lineare Korrelation. Da der p-Wert 0,32 (Plasma) bzw. 0,48 (Lysat) beträgt, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

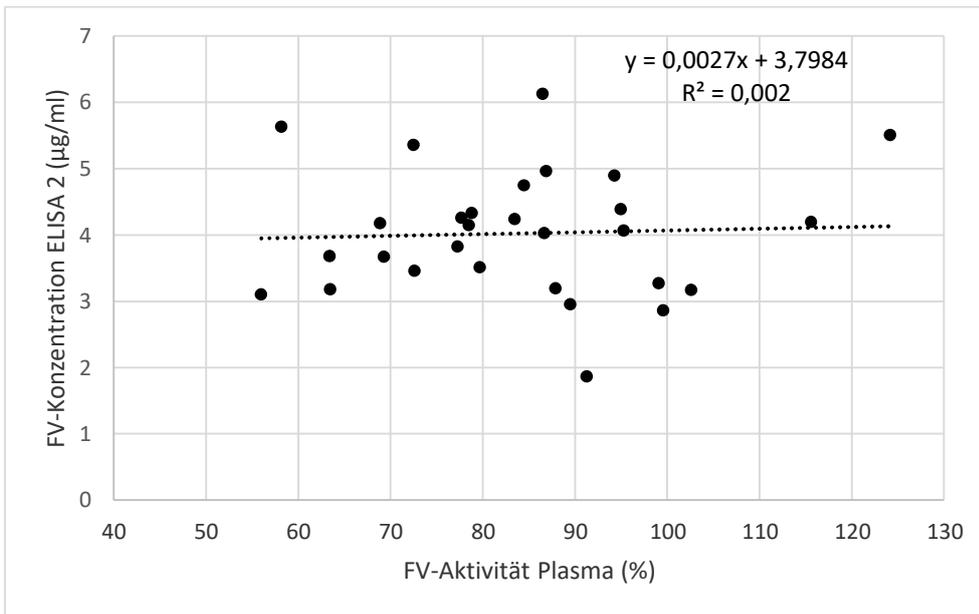


Abbildung 13: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 2 gemessene FV-Konzentration der Proben

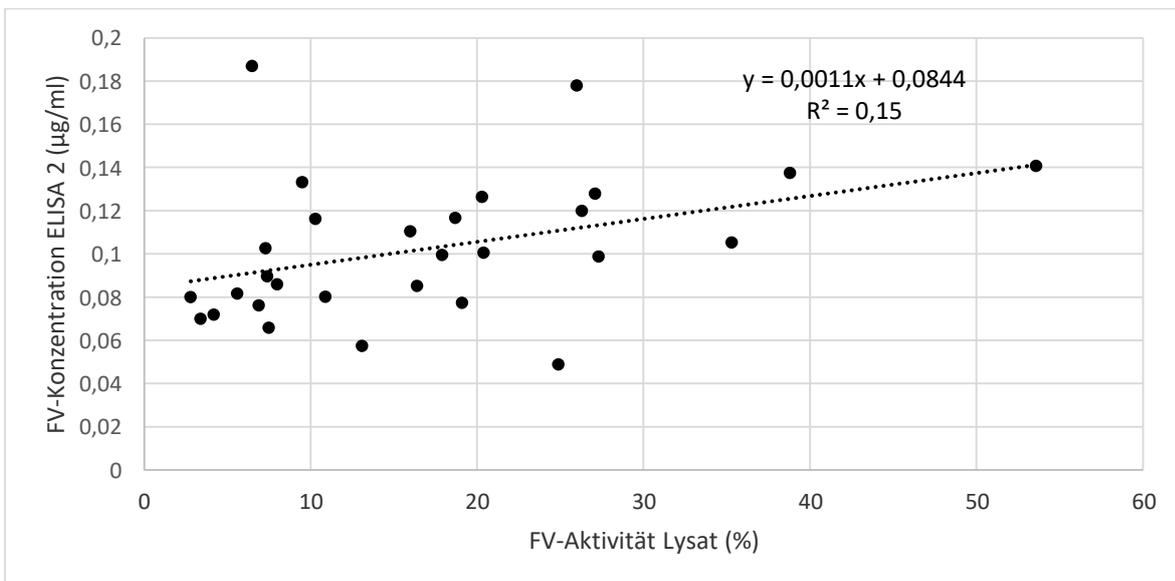


Abbildung 14: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 2 gemessene FV-Konzentration der Proben

Es lassen sich in den Abbildungen 13 und 14 jeweils leicht positiv ansteigende Trendlinien erkennen, welche lediglich einen leicht positiven linearen Zusammenhang vermuten lässt. Der Korrelationskoeffizient betrug für die Plasmamessungen $r=0,045$ und für die Lysat-

messungen $r=0,39$. Dies bestätigt eine schwache lineare Korrelation für die Lysatmessungen. Für die Plasmamessungen bedeutet dieser Wert, dass es nahezu keinen Zusammenhang gibt. Da der p-Wert 0,817 (Plasma) beträgt, ist dieses Ergebnis nicht signifikant. Der p-Wert der Lysatproben bestätigt jedoch mit 0,038 eine Signifikanz des Ergebnisses.

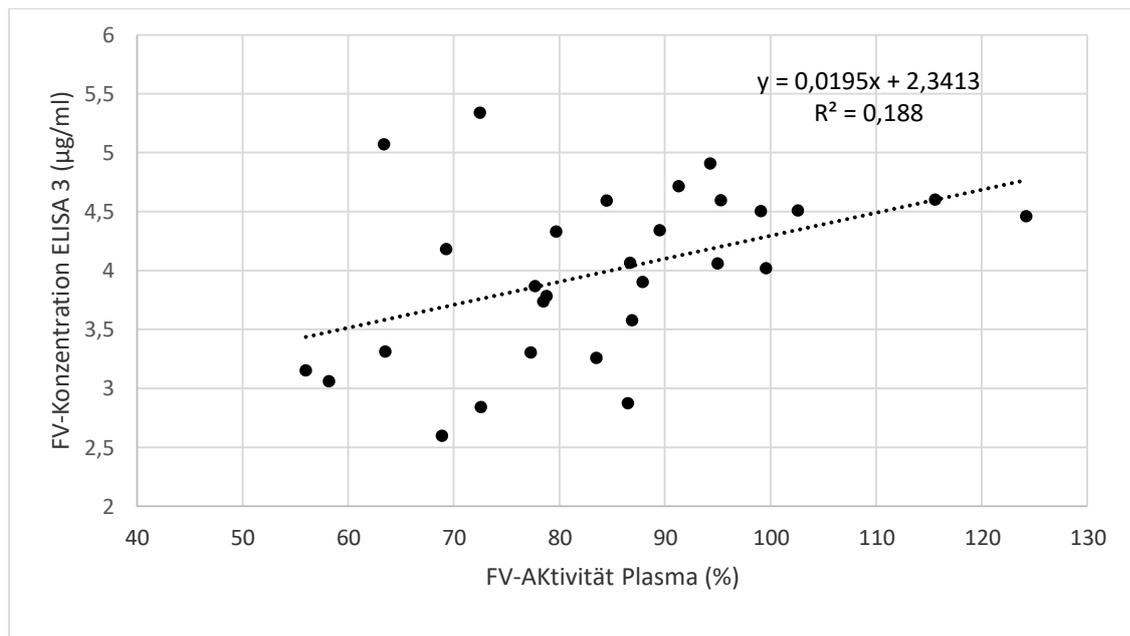


Abbildung 15: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 3 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben

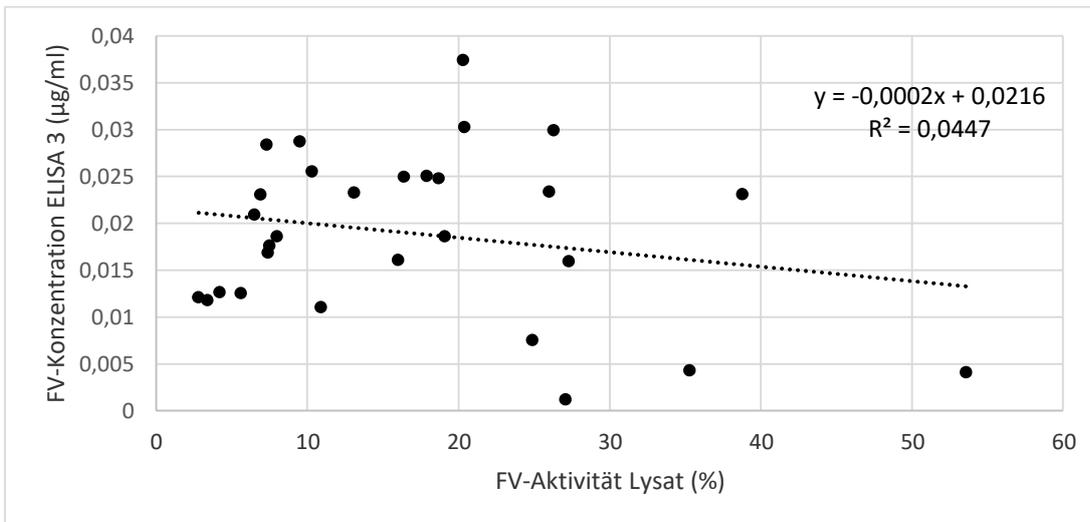


Abbildung 16: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 3 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben

Es lässt sich in den Abbildungen 15 und 16 eine leicht positiv ansteigende Trendlinie für die Darstellung der Plasmaprobenmessungen erkennen, welche lediglich einen leicht positiven linearen Zusammenhang vermuten lässt. Für die Lysatprobenmessungen zeigt sich eine leicht negativ abfallende Trendlinie. Der Korrelationskoeffizient betrug für die Plasmamessungen $r=0,434$ und für die Lysatmessungen $r=-0,212$. Dies bestätigt die nur schwache lineare Korrelation. Da der p-Wert 0,019 (Plasma) beträgt, ist dieses Ergebnis signifikant. Der p-Wert der Lysatproben deutet jedoch mit 0,271 auf keine Signifikanz des Ergebnisses hin.

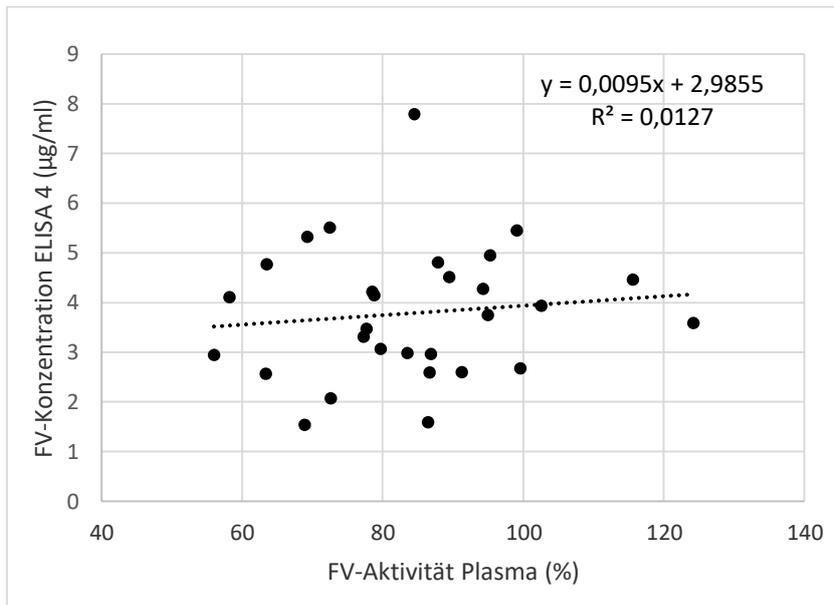


Abbildung 17: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 4 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben

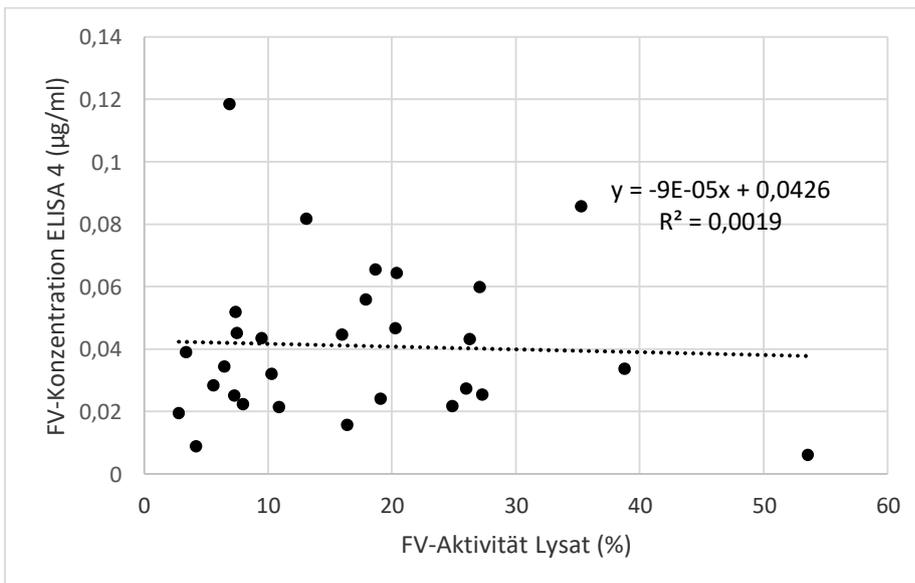


Abbildung 18: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 4 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben

Es lässt sich in den Abbildungen 17 und 18 eine leicht positiv ansteigende Trendlinie für die Darstellung der Plasmaprobenmessungen erkennen, welche lediglich einen leicht positiven linearen Zusammenhang vermuten lässt. Für die Lysatprobenmessungen zeigt sich eine leicht negativ abfallende Trendlinie. Der Korrelationskoeffizient betrug für die

Plasmamessungen $r=0,113$ und für die Lysatmessungen $r=0,043$. Für beide Messungen bedeuten diese Werte, dass es nahezu keinen Zusammenhang gibt. Da der p-Wert 0,561 (Plasma) bzw. 0,824 (Lysat) beträgt, ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen FV-Aktivität der Plasma- und Lysatproben und den jeweiligen Konzentrationsbedingungen mittels der vier ELISA sagen, dass bestenfalls schwache Korrelation nachzuweisen ist. Die beste Korrelation zeigten die Messungen für die Lysatproben mit ELISA 2 und die Messungen für die Plasmaproben mit ELISA 3. Am wenigsten Korrelation zeigten die Messungen mit ELISA 4.

4 Diskussion

Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von ELISA-Testen zur standardisierten Quantifizierung von Faktor V bzw. Faktor Va. Als Probenmaterial dienten Thrombozytenlysate und Plasmaproben von Blutspendern. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse und die Methodenentwicklung diskutiert.

4.1 Herstellung der Thrombozytenlysate

Für die quantitative Messung von thrombozytärem Faktor V(a) wurden die Thrombozyten zunächst durch mehrfache Zentrifugations- und Waschschriffe aus plättchenreichem Plasma isoliert und dann mithilfe von Triton X-100 lysiert, um, u.a., die enthaltenen Gerinnungsfaktoren freizusetzen. Für die Gewinnung und Isolierung des im Thrombozyten enthaltenen Faktor V wurde eine modifizierte Version der von Gould beschriebenen Anreicherung verwendet (Gould et al., 2004). Die Proben der Blutspender wurden durch eine zusätzliche Abnahme per Injektionsnadel gewonnen und nicht aus dem Predonationsbeutel entnommen, um zu verhindern, dass eine teilweise Aktivierung der Thrombozyten während einer Verweildauer im Predonationsbeutel stattfindet. Aufgrund der mechanischen

Belastung bei der Aufreinigung konnte eine mögliche teilweise Aktivierung der Thrombozyten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies hätte zur Folge, dass Faktor V bereits zum Teil aus der Alphagranula des Thrombozyten, den Speichern von u.a. Faktor V, ausgeschüttet würde, dass also der messbare Anteil im Thrombozytenlysat kleiner als im nativen Zustand wäre (Brandt et al., 2000; Jurk und Kehrel, 2010). Allerdings sollten die erhaltenen Messwerte innerhalb der verschiedenen Probanden aufgrund der Verwendung der gleichen Methode dennoch vergleichbar sein.

4.2 Verwendete Antikörper und ELISA-Tests

In dem ELISA mit dem Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP und in dem ELISA mit dem Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S kam mit dem AHV-5101 ein monoklonaler Antikörper zum Einsatz. Wie wir zeigen konnten, ist dieser Antikörper in der Lage, sowohl Faktor V als auch Faktor Va zu binden und ist auch im ELISA-Setting als Fängerantikörper einsetzbar. Ursprünglich geplant war der Einsatz dreier weiterer monoklonaler Antikörper, welche sich jedoch, wie in entsprechenden Vorversuchen gezeigt werden konnte, nicht für den Einsatz im ELISA eigneten. Mit den Antikörpern AHV-5102 und AHV-5112 konnten keine erfolgreichen Messungen im ELISA durchgeführt werden, da nur sehr schwache Bindungen detektierbar waren. Auch im Einsatz als ELISA im Biolayer-Interferometrie Versuch zeigten sich keine Bindungen an Faktor V oder Faktor Va. Bei der Verwendung des AHV-5146 war nur unter bestimmten Voraussetzungen eine Faktor V Bindung möglich, jedoch für die hier entwickelten Sandwich-ELISA war auch dieser nicht einsetzbar. Im Biolayer-Interferometrie Versuch zeigte sich keine Bindung von Faktor V, und im ELISA konnte der Antikörper Faktor V nur detektieren, wenn dieser direkt, also ohne Fängerantikörper, auf die Platte gegeben wurde. Dies sagt grundsätzlich aus, dass eine Bindung des Antikörpers an Faktor V erfolgen kann, jedoch nicht in den nötigen Versuchssituationen für einen Sandwich-ELISA. Eine mögliche Erklärung für den erfolgreichen Einsatz im direkten ELISA könnte sein, dass der Faktor V sich bei der Fixierung direkt an die Platte in der Art entfaltet hat, dass die Bindungsstelle für den AHV-5146 freigegeben wurde. Diese Formation könnte im Sandwich-ELISA und in der Biolayer-Interferometrie nicht so gegeben gewesen sein, sodass der Antikörper nicht an seine Bindungsstelle binden konnte. Auch der Versuch, das Faktor V Protein durch Zugabe von Harnstoff zu entfalten, blieb erfolglos.

Bindungseigenschaften von SAFV-AP

Der affinitätsgereingte Antikörper SAFV-AP bindet spezifisch an der schweren Kette des Faktor V im Bereich der Aminosäuren 500-513. Sowohl im ELISA als auch in der Biolayer-Interferometrie zeigte sich eine gute Bindungsfähigkeit für Faktor V. Jedoch war dies nur in der Funktion als Detektionsantikörper möglich. Bei den Versuchen, Faktor Va zu binden, zeigte sich jedoch in der Biolayer-Interferometrie keine Bindung, und im ELISA eine sehr schwache Bindung, die kaum über den Leerwert hinaus ging. Es stellen sich die Fragen, warum der SAFV-AP zum einen nur als Detektionsantikörper einsetzbar war, und zum anderen warum Faktor V gut detektierbar, nicht bzw. sehr schlecht aber Faktor Va detektierbar war. Im Vergleich dazu wurde der Antikörper in dem standardisierten ELISA-Kit von Affinity Biologicals (ELISA 1) mit dem SAFV-AP als Fänger- und dem SAFV-HRP als Detektionsantikörper erfolgreich als Fängerantikörper eingesetzt, jedoch waren hier die Messwerte insgesamt vor Allem für die Messungen der Lysatproben am geringsten. Für beide Fragestellungen gilt vermutlich, dass die Bindestelle für den SAFV-AP unzugänglich war. Dies kann an einer unterschiedlichen Proteinfaltung bei der Bindung an den ELISA liegen, wobei es eine Rolle zu spielen scheint, ob der SAFV-AP direkt an die Platte fixiert wurde oder als Detektionsantikörper zugegeben wurde. Da beim Einsatz des oben beschriebenen ELISA-Kit jedoch eine Faktor V Bindung an den Fängerantikörper SAFV-AP stattfand, scheint auch der Coating- und der Assaypuffer eine Rolle zu spielen, welche hier grundsätzlich anders gewählt waren als in den anderen drei entwickelten ELISA. In Bezug auf die geringe Bindungsfähigkeit an Faktor Va könnte die Aktivierung durch Schnitte an den bekannten Schnittstellen zu einer Faltung des Proteins geführt haben, sodass die Bindestelle für den SAFV-AP unzugänglich wurde. In dem Bindungsbereich des Antikörpers (Aminosäuren 500-513 der schweren Kette) liegt zudem die kinetisch präferierte Schnittstelle für die Inaktivierung des Faktor Va (Arg506). Dies bedeutet, sollte Faktor Va inaktiviert worden sein, wäre die Bindestelle für den Antikörper zerstört worden.

Bindungseigenschaften von PAHFV-S

Wie oben bei dem Einsatz des SAFV-AP bereits erwähnt, scheint Faktor Va in viel geringerem Maße gebunden werden zu können als Faktor V. Dies galt auch für die Versuche, in denen der PAHFV-S als Detektionsantikörper verwendet wurde (ELISA 2). Die oben

genannten Erklärungsansätze können hier jedoch nicht angeführt werden, da der polyklonale PAHFV-S nicht auf das eine spezifische Epitop zwischen den Aminosäuren 500-513 angewiesen war. Es scheint überraschend, dass auch in diesem ELISA nur wenig Faktor Va detektiert werden konnte.

4.3 Vergleich mit bisheriger Forschung/Literatur

In dieser Arbeit wurden durch die ELISA Methoden entwickelt, um die Menge von Faktor V quantitativ zu messen. Zum Vergleich der quantitativen Bestimmung von Faktor V eignet sich die Arbeit von Tracy (Tracy et al., 1982) welcher eine mittlere Faktor V Konzentration im Plasma von 7 µg/ml (4-14 µg/ml) feststellte. Die damals ermittelten Werte dienen bisher als Standardwerte. Dieser hatte zur Detektion und quantitativen Messung des Proteins die Konzentration von thrombozytärem Faktor V durch einen Antikörper-basierten Radioimmunoassay und eine Gesamt-Faktor V Aktivitätsmessung durch Einsatz eines Bioassay ermittelt. In den in dieser Arbeit eingesetzten vier ELISA (ELISA 1-4) wurden jeweils im Durchschnitt Plasmakonzentrationen von 3,51; 4,02; 3,98 und 3,79 µg/ml gemessen. Diese Werte liegen somit im unteren Referenzbereich die 1982 von Tracy ermittelt wurden. Einzelne Werte von z.B. 7,89 µg/ml (im ELISA 1 mit dem Fängerantikörper SAFV-AP und Detektionsantikörper SAFV-HRP) oder 7,79 µg/ml (im ELISA 4 mit dem Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S) lagen jedoch im Bereich der von Tracy beschriebenen durchschnittlichen 7 µg/ml. Die von Tracy 1982 ermittelten Konzentrationen von thrombozytärem Faktor V betragen 0,63-1,93µg Faktor V pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten, also 4612-14128 Faktor V Molekülen pro Thrombozyt. Die in dieser Arbeit durch den Einsatz von vier Sandwich-ELISA ermittelten Werte ergaben im Durchschnitt 0,1024 µg/ml, 0,0014 µg/ml, 0,0189µg/ml und 0,041µg/ml Faktor V in den Lysatproben. Durch die Konzentrationsmessung von Faktor V konnte über das bekannte Volumen der Lysatproben und der gemessenen durchschnittlichen Thrombozytenzahl ein Vorliegen von etwa 543,88 Faktor V Molekülen pro Thrombozyt errechnet werden. Diese Zahl unterscheidet sich deutlich von denen durch Tracy erhobenen Werten. Bekannt ist zudem ein Verteilungsverhältnis des Faktor V Pools zwischen einem Vorliegen im Plasma von etwa 80 % und einem Vorliegen in der Alpha-Granula eines Thrombozyten von etwa 20 %, welche ebenfalls von Tracy 1982 ermittelt wurden (Chesney et al., 1981; Tracy et al., 1982; Wencel-Drake et al., 1986). Die Berechnungen dieser Arbeit hier stimmen mit

den bekannten Werten nicht überein, der Faktor V Anteil im gesamten Thrombozytenpool wurde auf etwa 3,26% und der Anteil im Plasma auf 96,74% berechnet. Dies könnte in einer unzureichenden Messfähigkeit der ELISA des Faktor V im Thrombozytenlysat begründet sein. Wie bereits oben diskutiert, kann die Konfiguration der hier verwendeten ELISA zu divergierenden Ergebnissen geführt haben. Verschiedene Antikörper scheinen unterschiedlichen Zugang zu einer möglichen Bindung an Faktor V und an Faktor Va zu finden, durch mögliche Proteinfaltungsprozesse nach Aktivierung sind möglicherweise Bindungsstellen für die Antikörper blockiert, sodass weniger Faktor Va detektiert werden konnte. Wie gut zugänglich für eine Antikörperbindung das Faktor V Molekül im Allgemeinen für die hier verwendeten Antikörper ist im Vergleich zu den antikörperbasierten Messverfahren bei Tracy lässt sich allein durch den Versuchsaufbau des ELISA ebenfalls nicht eruieren. Die oben beschriebene mögliche teilweise Aktivierung der Thrombozyten könnte ebenfalls zu einem falsch niedrigen Ergebnis beitragen. Die in dieser hier durchgeführten Arbeit ermittelten Konzentrationen des thrombozytären Faktor V können auch mit der Arbeit von (Pfahler, 2022) verglichen werden. In dieser Arbeit wurde mittels koagulometrischer Bestimmung eine Faktor V Konzentration von $0,87\mu\text{g}$ pro $2,5 \cdot 10^8$ Thrombozyten $\pm 0,4 \mu\text{g}$ pro $2,5 \cdot 10^8$ Thrombozyten gemessen. Dieser Wert lag genau im Bereich des auch schon von Tracy 1982 ermittelten Wertes, und somit im Durchschnitt höher als in dieser Arbeit hier gemessen werden konnte. Eine Messung des plasmatischen Faktor V wurde im Vergleich nicht durchgeführt.

In der Arbeit von (Pfahler, 2022) wurde eine koagulometrische Messmethode angewandt und die Faktor V Aktivität bestimmt. Die Methode von Tracy 1982 stützte sich auf eine Methode, welche auf einer Erkennung der Strukturen von Faktor V beruhte und antikörpervermittelt angewendet wurde. Ein Vergleich der mit den unterschiedlichen Methoden erhobenen Befunde gestaltet sich deshalb schwierig. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Sandwich-ELISA eine antikörperbasierte Strukturerkennung von Faktor V angewendet. Heute besitzt man jedoch mehr Grundkenntnisse über den strukturellen Aufbau des Faktor V, des Faktor Va Moleküls und den verschiedenen Modifikationen des plasmatischen und des thrombozytären Faktor V als damals. Diese Grundkenntnisse können auch dabei helfen, die hier gemessenen Ergebnisse einzuordnen im Vergleich zu den

beiden oben genannten Studien. Die Erkenntnis, dass sich plasmatischer und thrombozytärer Faktor V strukturell unterscheiden (Bouchard et al., 2015; Monković und Tracy, 1990) könnten sowohl bei den Studien von Tracy 1982 als auch bei den hier durchgeführten ELISA zu falsch niedrigen Ergebnissen von vor allem des thrombozytären Faktor V geführt haben, da die verwendeten Antikörper je nach Faktor V Form schlechter gebunden haben könnten. Grundsätzlich sollte bedacht werden, dass die technische Ausstattung der Studien von 1982 nicht mit den heutigen verglichen werden können, dies kann ebenfalls zu Ungenauigkeiten und Abweichungen der Messergebnisse beigetragen haben.

4.4 Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Messergebnisse der vier ELISA auf Basis der Bindungsfähigkeiten der Antikörper

Detektion von Faktor V und Faktor Va

Dass der SAFV-AP die Eigenschaft zu besitzen scheint, Faktor Va nicht oder nur im geringen Maße binden zu können, lässt darauf schließen, dass in den ELISA, in denen er eingesetzt wurde (ELISA 1 mit Fängerantikörper SAFV-AP und Detektionsantikörper SAFV-HRP und der ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP), das Messsignal allein von Faktor V hervorgerufen wurde. Vergleicht man die durchschnittlichen Messergebnisse von dem ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP (0,0189 µg/ml) und dem ELISA 4 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S (0,041 µg/ml) in Bezug auf die Lysatproben, so fällt auf, dass beim Einsatz von letzterem etwa 2fach höhere Werte gemessen wurden. Der einzige Unterschied der beiden ELISA lag in der Verwendung des Detektionsantikörpers. Bei dem einen wurde der SAFV-AP, bei dem anderen der PAHFV-S eingesetzt. Die höheren Messwerte könnten auf zwei Umstände zurückzuführen sein. Zum einen bindet der polyklonale PAHFV-S an mehr Epitope des Faktor V bzw. Faktor Va als der SAFV-AP, welcher nur in einem kleinen Bereich der schweren Kette spezifisch bindet. Zum anderen ist der SAFV-AP nicht oder kaum fähig, Faktor Va zu binden, es könnte also sein, dass dieser ELISA einen relevanten Anteil der Moleküle nicht gebunden hat, die von dem ELISA 4 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S jedoch gemessen wurden. Ginge man davon aus, dass Faktor V/Faktor Va von jeweils nur einem

Detektionsantikörper gebunden werden können, so würde dies dafür sprechen, dass nur etwa die Hälfte des Messsignals des ELISA 4 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S durch Faktor V-, und die andere durch Faktor Va-Moleküle hervorgerufen wurde. Dies würde bedeuten, dass etwa 50% des Faktor V-Pools im Thrombozyten in aktivierter Form vorliegt. Da aber wahrscheinlich beide oben beschriebenen Umstände eine Rolle spielen, liegt der wahre Faktor Va Anteil wohl unter 50%. Ähnliche Überlegungen können in Bezug auf die Betrachtung von dem ELISA 1 mit Fängerantikörper SAFV-AP und Detektionsantikörper SAFV-HRP und dem ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP), angestellt werden. Sie sind die beiden ELISA, in welchen der SAFV-AP eingesetzt wurde, einmal als Fängerantikörper und einmal als Detektionsantikörper. Diese beiden ELISA zeigten die insgesamt niedrigsten durchschnittlichen Messwerte für die Lysatproben. Dies könnte wiederum daran liegen, dass Faktor Va zu einem großen Anteil im Thrombozyten vorliegt, welchen der SAFV-AP nicht bzw. kaum binden kann, oder an dem Umstand, dass er durch seine Affinitätsreinigung keine so hohen Messsignale hervorrufen kann wie ein „echter“ polyklonaler Antikörper. Der ELISA 1 mit Fängerantikörper SAFV-AP und Detektionsantikörper SAFV-HRP zeigt im Vergleich zu dem ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP), noch niedrigere Messsignale, dies ist vermutlich über den grundsätzlich anderen Aufbau und der Verwendung anderer Waschpuffer und Lösungspuffer zu erklären.

Vergleich der Messfähigkeiten der ELISA

Betrachtet man nun den ELISA 2 mit Fängerantikörper PAHFV-S und Detektionsantikörper PAHFV-S in biotinylierter Form, erscheint es mit beiden oben genannten Erklärungsansätzen logisch, dass dieser die im Durchschnitt höchsten Messsignale registrierte (0,1024 µg/ml). Der als Fänger- und Detektionsantikörper eingesetzte PAHFV-S kann jede Faktor V Form binden, und als polyklonaler Antikörper kann er zudem an viele Epitope des Moleküls binden. Ein Vergleich mit dem ELISA 4 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S, in welchem der Antikörper ebenfalls als Detektionsantikörper eingesetzt wurde, ist jedoch schwierig. Die Messwerte waren im Schnitt bei dem ELISA 2 mit Fängerantikörper PAHFV-S und Detektionsantikörper PAHFV-S in

biotinylierter Form etwa 2,5fach höher (2,497fach). Dies kann an dem Einsatz des monoklonalen AHV-5101 als Fängerantikörper liegen, jedoch war auch die ELISA-Plattenbeschichtung bei den beiden ELISA 3 und 4, in welchen der monoklonale Antikörper AHV-5101 zum Einsatz kam, durch die zuerst durchgeführte Beschichtung der ELISA-Platten mit BSA-Biotin und mit Streptavidin, grundsätzlich eine andere als in den anderen beiden ELISA. Der Einsatz der vier verschiedenen ELISA zeigte bei der Messung der Plasma-proben nicht so deutliche Unterschiede wie bei den oben beschriebenen Lysatmessungen. Auch hier wurden mit dem ELISA 2 mit Fängerantikörper PAHFV-S und Detektionsantikörper PAHFV-S in biotinylierter Form im Durchschnitt die höchsten Messwerte (4,02 µg/ml) ermittelt, jedoch unterscheidet sich dieser Wert nur marginal von den Werten des ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP (3,98 µg/ml). Die oben beschriebene Erklärung könnte auch hier gelten, dass nämlich die Kombination aus zwei polyklonalen Antikörpern die höchsten Messsignale hervorrufen kann, durch die vielen möglichen Epitope, die gebunden werden können. Überraschend ist zum einen, dass der ELISA mit einem monoklonalen Fänger- und einem affinitätsgereinigten Detektionsantikörper, welche in ihren möglichen Bindungsstellen eingeschränkter sind, zu ähnlich hohen Messergebnissen gelangten. Zum anderen ist auch überraschend, dass die Messwerte des ELISA 4 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper PAHFV-S im Durchschnitt unter denen des ELISA 3 mit Fängerantikörper AHV-5101 und Detektionsantikörper SAFV-AP lagen. Dies könnte durch die Affinitätsreinigung des SAFV-AP erklärt werden, wodurch dieser eine höhere Affinität zu Faktor V zeigen könnte als die anderen Antikörper. Als Kalibrator wurde Faktor V verwendet.

Messergebnisse der Lysatproben

Besonders wichtig für die Charakterisierung von Faktor V bzw. Faktor Va war die Untersuchung der Lysatproben. Wie die unterschiedlichen Messsignalhöhen zustande gekommen sein könnten, wurde bereits unter Punkt 5.5.1 diskutiert. Es stellt sich des Weiteren die Frage, warum die Lysatproben viel schwächere Signale hervorriefen bzw. warum so geringe Faktor V Konzentrationen gemessen wurden im Vergleich zu den Plasmaproben. Aus den durchschnittlichen Konzentrationen des Faktor V wurde eine durchschnittliche

Molekülanzahl von 544 Molekülen Faktor V pro Thrombozyt errechnet. Diese Zahl unterscheidet sich stark von den Ergebnissen von Tracy 1982, welche 4612-14128 Moleküle Faktor V pro Thrombozyt ermittelten. Der Anteil des thrombozytären Faktor V betrug bei ihnen etwa 18-25%, in dieser Arbeit hier nur etwa 3,26%. Einen ähnlichen Anteil konnten Tracy nur bei bovinen Blutproben feststellen, bovine Thrombozyten beinhalten demnach etwa 400-800 Faktor V Moleküle, was einem Anteil von etwa 2-5% entsprach. Mögliche Erklärungen für die geringen Faktor V Konzentrationen in den ELISA Messungen hier könnten eine unzureichende Bindungsfähigkeit der Antikörper sein. Wie bereits oben diskutiert scheint vor Allem der SAFV-AP Faktor Va nicht oder kaum binden zu können. Da thrombozytärer Faktor V bereits zum Teil im aktivierten Zustand vorliegt (Gould et al., 2004; Monković und Tracy, 1990), ist es möglich, dass ein signifikanter Anteil des Faktor V von diesen ELISA nicht detektiert wurde. Zudem fand Gould 2004 heraus, dass auch strukturelle Unterschiede zwischen plasmatischem und thrombozytärem Faktor V bestehen. So besitzt die schwere Kette des thrombozytären Faktor V nur etwa 10-15% des Phosphoserins im Vergleich zum plasmatischen Faktor V. Die leichte Kette wies einen Schnitt an Tyr1543 statt an Arg1545 auf, welcher verantwortlich für einen wesentlichen Anteil der Kofaktoraktivität ist. Zudem ist thrombozytärer Faktor V im Vergleich zu plasmatischem O-glykosyliert an Thr402. Diese Modifizierung mit einem GlcNAc oder GalNAc Rest ist eine häufige Modifizierung und könnte dem Protein neue Funktionen vermitteln. Hier scheint es die Phosphorylierung an Serinen und Threoninen zu blockieren (Gould et al., 2004). Diese Verlinkung kann auch großen Einfluss auf die Struktur des Proteins nehmen, sowohl in direkter Umgebung des Zuckerrestes als auch an weiter entfernten Stellen des Proteins (Gould et al., 2004). Des Weiteren zeigt sich der Faktor V resistent gegen eine Phosphorylierung an Ser692. Diese Phosphorylierung ist normalerweise aber essentiell für die Inaktivierung des Faktor V (Camire et al., 1998a). Die vielfältigen Modifizierungen, welche im Megakaryozyten stattfinden, sind durch die verminderte Phosphorylierung begünstigt und geschehen durch Schnitte durch eine Megakaryozytenprotease. Auch an der leichten Kette fanden sich in den Versuchen von Gould Veränderungen im thrombozytären Faktor V/ Va. Hier wurden N-gebundene Kohlenhydratreste beispielsweise an Asn1982 gefunden (Gould et al., 2004) und N-gebundene Glykoformen an Asn2181. Insgesamt wurden in den Untersuchungen nur 40% der schweren Kette des Faktor V mit

Massenspektroskopie untersucht (Gould et al., 2004). Eine oder mehrere dieser Modifizierungen des thrombozytären Faktor V könnten zu einem schlechteren bzw. anderem Bindungsverhalten der in den ELISA verwendeten Antikörper im Vergleich zur Messung des plasmatischen Faktor V geführt haben.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Die entwickelten ELISA dienen der quantitativen Bestimmung von Faktor V und Faktor Va. Durch die unterschiedlichen Bindungsstellen der verwendeten Antikörper könnte eine differenzierte Analyse des Faktor V erfolgen. Dies könnte bei der Diagnostik und bei der Entscheidung einer Therapie von Krankheitsbildern wie z.B. dem Faktor-V-Mangel hilfreiche Informationen liefern. Im Folgenden werden Studien erläutert, die bereits die Wichtigkeit einer möglichen Differenzierung von thrombozytären und plasmatischem Faktor V beschreiben. (Boujrad et al., 2017; Drzymalski et al., 2019; Lak et al., 1998) führten Studien an Patienten mit Faktor-V Mangel durch, in welchen speziell eine effektive und sichere Therapie der verstärkten Blutungen der Patienten auf den Erkenntnissen über thrombozytären und plasmatischen FV aufbaute. Zudem gelang es (Ren et al., 2017), einen entscheidenden Einfluss von speziell thrombozytären Faktor V auf arterielle Thrombosen nachzuweisen im Gegensatz zu plasmatischem Faktor V. (Yang et al., 2017) untersuchte den Einfluss von Faktor V auf die Angiogenese und stellte fest, dass auch hier thrombozytärer Faktor V einen anderen Einfluss besitzt als plasmatischer Faktor V. Zuletzt wird beschrieben, wie auch (Albagoush et al., 2022) mögliche therapeutische Konsequenzen aus einer genaueren Charakterisierung von Faktor V bei Vorliegen einer Faktor-V-Leiden Mutation diskutiert. Faktor-V Mangel beruht auf einer Mutation des F5-Gens (1q23), wodurch die Produktion des plasmatischen Faktor V reduziert ausgeführt wird. Klinisch zeigt sich jedoch eine hohe Variabilität in Bezug auf die Schwere der Blutungsneigung (Boujrad et al., 2017). Er stellt eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa 1:1 Mio dar und wurde 1944 von Owren entdeckt (Acharya et al., 2004; OWREN, 1947). (Boujrad et al., 2017) beschrieb den Fall eines Patienten mit vererbtem Faktor-V-Mangel, dessen Faktor-V Spiegel bei 2% lag (elterliche Spiegel bei 44% und 59%). Aufgrund der Messung dieser Konzentrationen konnte eine angepasste Therapie mit FFP (Frischem gefrorenem Plasma) begonnen werden, wodurch die Blutungsproblematik des

Kindes gestoppt werden konnte. Song JW berichten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenkonzentration und auch der katalytischen Untereinheit des thrombozytären Faktor V und der Blutungsneigung gebe, nicht aber zwischen der Konzentration des plasmatischen Faktor V und der Blutungsneigung (Song et al., 1987). Es konnte keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration von Faktor V im Plasma und der Blutungsschwere festgestellt werden (Song et al., 1987). Auch (Lak et al., 1998) führten 1998 Studien über einzelne Fälle von Faktor-V Mangel Patienten durch. Diese fielen klinisch durch verstärkte Epistaxis und verstärkte postoperative Blutungen auf. Ihre Spiegel an plasmatischem Faktor V lagen zwischen 1-10%. Auch hier konnte die Schwere der Blutungen nur teilweise mit diesen Konzentrationen korreliert werden. Schwankende Thrombozytenzahlen wurden hier als mögliche Erklärungen für die variabel ausfallenden Blutungsschweregrade in Erwägung gezogen. Ebenfalls wurde hier die Therapie mit FFP eingeleitet (Lak et al., 1998). Diese beschriebenen Fälle zeigen die Wichtigkeit auf, die Faktor V Konzentration differenziert messen zu können, um angemessen eine Blutungsneigung bei Faktor-V Mangel therapieren zu können. Könnte man den thrombozytären Faktor V differenziert vom plasmatischen Faktor V messen, indem er anhand seiner strukturellen Unterschiede anders durch ein Messsystem erkannt würde, könnte möglicherweise eine genauere Aussage über das tatsächliche Blutungsrisiko des individuellen Patienten getroffen werden. Die Indikationsstellung zur Therapie mit FFP oder Thrombozytentransfusion könnte spezifischer gestellt werden und auch wäre eine genauere Erfolgskontrolle der Therapie möglich. (Drzymalski et al., 2019) beschrieb eine Fallstudie zu Schwangerschaft bei Vorliegen eines angeborenen Faktor-V Mangels. Hier wurde versucht, durch Gabe von FFP den Plasmaspiegel von Faktor V bei 50% aufrechtzuerhalten. Nach der Transfusion von FFP stieg der Plasmaspiegel von Faktor V zunächst von 34% auf 55% an, um dann jedoch schnell wieder abzusinken, wodurch viele zusätzliche Transfusionen nötig waren. Als Problem trat durch die dafür nötigen zahlreichen Transfusionen von FFP und die dadurch entstehende große Volumenbelastung ein Lungenödem auf. Als Alternative wurde die Therapie mit Thrombozytentransfusionen durchgeführt, welches ebenfalls die Blutungen verhindern konnte, aber nicht zu einem Lungenödem führte. Dies stellte also eine wirksame Alternative dar. Thrombozytärer Faktor V besitzt eine bessere prokoagulatorische Funktion durch lokal etwa 100-fach höhere Konzentrationen als von

plasmatischem Faktor V (Drzymalski et al., 2019). In diesem Zusammenhang schlug Drzymalski auch die Entwicklung von Assays vor, mit welchen thrombozytärer Faktor V spezifischer detektiert werden kann, um die Anleitung zur Therapie mit FFP oder Thrombozytentransfusionen zu optimieren (Spiezia et al., 2012). Er beschrieb, dass die richtige Messung der Wirkung der Thrombozytentransfusion eine Herausforderung sei. Eine nennenswerte Änderung des plasmatischen Faktor V sei nicht zu erwarten, da der Großteil des Faktor V im Thrombozyten verbleiben würde. Nach einem Fallbericht (Chediak et al., 1980) sei der Faktor V Plasmaspiegel nur deshalb nach einer Thrombozytentransfusion angestiegen, da in diesem Zusammenhang der Faktor-V-Inhibitor abgenommen habe. Er schlägt eine direkte Messung mit Radioimmunassay von thrombozytärem Faktor V oder eine indirekte Messung mit den Prothrombinase- und Tenase-Assays vor, um eine korrekte Messung der Faktor V Aktivität im Thrombozyten durchzuführen wie (Perdekamp et al., 2006) zeigten. Diese Tests würden sich jedoch nur für die Analyse vor der Thrombozytentransfusion eignen, um die Aktivität in den zu transfundierenden Thrombozyten zu ermitteln. In-vitro-Studien hätten gezeigt, dass die Faktor-V-Spiegel in gelagerten Blutplättchen nach 172 Stunden auf weniger als 30% sinken, was die Wirksamkeit der Transfusion gealterter Blutplättchen beeinträchtigen könnte (Ciavarella et al., 1986). (Bouchard et al., 2015) beschrieb einen Fall eines 67-jährigen Patienten mit angeborenem FV-Mangel, welcher vor allem unter Epistaxis und verlängerten Blutungen litt, welcher für eine Arthroplastik der Hüfte mit FFP behandelt wurde. Aus seinem Blut wurden zur Diagnostik Plasma und Thrombozytenlysatproben gewonnen. Die Lysatproben wurden mit Thrombin aktiviert. Daraufhin wurden thrombozytärer und plasmatischer Faktor V im Western Blot visualisiert. Es wurden 167 Faktor V-Varianten gefunden, von denen zwei mit Faktor V-Mangel assoziiert sein können durch ihre Fehlfunktion. Nach Zugabe von FFP erhöhte sich die Menge des plasmatischen Faktor V schnell, sank jedoch auch schnell wieder ab. Thrombozytärer Faktor V war jedoch bereits vor der Zugabe in größerem Ausmaß vorhanden, und nach der Zugabe von FFP blieb die angestiegene Menge an thrombozytärem Faktor V auch länger erhalten als die des plasmatischen. Thrombozytärer Faktor V war noch 10 Tage nach Verabreichung des FFP in der Lage, die Thrombinbildung zu unterstützen. Obwohl plasmatischer Faktor V komplett fehlte und nur 7% der normalen Menge des thrombozytären Faktor V vorhanden war, reichte dies aus, um als effektiver Kofaktor

genug hämostatische Kompetenz zu besitzen. Zusammenfassend wurde hier berichtet, dass Patienten mit einem Mangel an plasmatischen, jedoch ausreichendem thrombozytären Faktor V nach Operationen keine vermehrten Blutungen zeigten (Bouchard et al., 2015). In diesem Zusammenhang konnten schwere Blutungen nach Berichten gut mit Thrombozytentransfusionen gestoppt werden bei Faktor V-Mangel (Bouchard et al., 2015).

(Ren et al., 2017) beschrieb einen Zusammenhang zwischen Faktor V und TFPI, welcher das Risiko einer venösen Thrombose beeinflusst (Duckers et al., 2010). Er untersuchte die Rolle von Faktor V bei der arteriellen Thrombose. Bei Faktor V-Mangel Patienten zeigten diejenigen, denen plasmatischer Faktor V fehlte, jedoch thrombozytären Faktor V besaßen, wenige Blutungssymptome. Also scheint thrombozytärer Faktor V für die Thrombinbildung essentiell zu sein (Duckers et al., 2010). Die Bedeutung von thrombozytärem Faktor V bei der Entstehung eines prokoagulatorischen Phänotyps wird durch mehrere Studien gestützt (Bouchard et al., 2015; Gould et al., 2004; Ren et al., 2017). Thrombozytärer Faktor V liegt teilweise aktiviert vor. Dieser wurde teilweise schon im Megakaryozyten modifiziert (Monković und Tracy, 1990; Ren et al., 2017). Deshalb trägt dieser Faktor V zu einer verstärkten prothrombotischen Fähigkeit bei und fördert Thrombosen. In Rens Mäuseversuchen förderte thrombozytärer Faktor V die arterielle Thrombose nach einer Verletzung der Halsschlagader. Mäuse mit höheren Spiegeln von thrombozytärem Faktor V hatten nach der Verletzung die schnellsten thrombotischen Verschlüsse. Die Transfusion von Thrombozyten wiederum mit hohen Faktor V- Spiegeln in Mäuse ohne nachweisbarem thrombozytärem Faktor V reduzierte die verlängerte Blutungszeit. Die Ergebnisse bestätigten den prothrombotischen Charakter von thrombozytärem Faktor V. Die Transfusion von plasmatischem Faktor V verkürzte die Blutungszeit dagegen nicht. Die gezielte Analyse von thrombozytärem Faktor V könnte also ein Ansatz zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sein (Ren et al., 2017). Ebenso könnte man durch die gezielte Messung von thrombozytärem Faktor V wie zum Beispiel durch die hier entwickelten ELISA eine Einschätzung des Risikos einer arteriellen Thrombose besser beurteilen.

(Yang et al., 2017) fand heraus, dass thrombozytärer Faktor V in einem Ischämiemodell die Angiogenese fördert. Nach Ligatur der Femoralarterie war die Durchblutung der Gliedmaßen bei Mäusen mit erhöhtem thrombozytärem Faktor V erhöht. Die wichtigen angiogenesefördernden Faktoren wurden vermehrt exprimiert unter diesen Bedingungen. Bei Mäusen, welche keinen thrombozytären Faktor V besaßen, unterstützte die Transfusion von Thrombozyten mit vermehrtem thrombozytärem Faktor V die ischämiebedingten Beeinträchtigungen und förderte die Kapillarbildung sowie die Thrombinaktivität. Thrombozyten mit erhöhten Spiegeln von thrombozytärem Faktor V förderten zudem die Migration von Endothelzellen. Abhängig von der Faktor V Konzentration konnten mittels immunhistochemischer Anfärbungen vermehrt aktivierte Thrombozyten im ischämischen Gewebe gezeigt werden. Daraus resultierend könnte also eine spezifischere Steuerung der Angiogenese ermöglicht werden, wenn die Faktor V Konzentration gezielt moduliert werden könnte (Pfähler, 2022; Yang et al., 2017). Die spezifische Untersuchung der auf die Angiogenese einflussnehmenden Proteine könnte also zu neuen Therapieansätzen führen. Hier wird berichtet, dass thrombozytärer Faktor V eine wichtige Rolle spielt (Yang et al., 2017). Die spezifische Faktor V Messung über einen ELISA, wie in dieser Arbeit entwickelt wurde, könnte diese Modulationen der Konzentrationen überwachen.

(Albagoush et al., 2022) stellte Überlegungen zur Faktor-V-Leiden Mutation an. Die Faktor-V-Leiden Mutation führt zu einer Eliminierung der Spaltstelle von Faktor V und Faktor Va. Dies resultiert in einem erhöhten Thromboserisiko. Ob jedoch eine medikamentöse Therapie zur Risikominderung eines thrombotischen Geschehens eingeleitet wird, benötigt noch viel klinische Erfahrung und Feingefühl. Am häufigsten findet sich jedoch nur der Befund der Mutation an sich, nur wenige der Patienten entwickeln in ihrem Leben eine VTE (5% der FVL-Heterozygoten und 20% der FVL-Homozygoten). Getestet auf die Mutation wird generell nur bei bestimmten Voraussetzungen und Risikokonstellationen. Träger der Mutation werden im Management thrombotischer Ereignisse nicht anders behandelt als die Normalbevölkerung. Sowohl die Auswahl des Antikoagulanz als auch die Dauer der Behandlung unterscheidet sich nicht, und hängt von der individuellen Risikokonstellation eines rezidivierenden Ereignisses ab. Ein Anteil der Mutationsträger erleidet statistisch jedoch ein thromboembolisches Ereignis. Eine weitere Charakterisierung des Faktor V könnte dazu beitragen zu unterscheiden, welche Mutationsträger grundsätzlich

ein höheres Thromboserisiko tragen und entsprechend könnte eine Risikoprophylaxe angepasst werden. Wenn durch eine spezifische Messung und damit Differenzierung von Faktor V, Faktor Va und Faktor-V-Leiden das Verhältnis dieser Proteine bei Faktor-V-Leiden Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ermittelt werden könnte, könnte festgestellt werden, ob diese Verhältnisse sich unterscheiden und somit zur Krankheitsentstehung der Thrombose beitragen könnten. Ein ELISA, in welchem Antikörper verwendet würden, die spezifisch jeweils diese Faktor V Varianten binden können, könnte also neue Aufschlüsse bringen. In den Vorversuchen wurden solche Antikörper verwendet (AHV-5112, AHV-5102), diese zeigten sich jedoch als nicht geeignet für die Verwendung im ELISA oder bei der Biolayer-Interferometrie.

5 Zusammenfassung

Faktor V stellt ein zentrales Protein mit vielfältiger Funktion innerhalb der Blutgerinnung dar. Es existieren unterschiedliche Varianten des Faktor V, welche sich strukturell und funktionell unterscheiden. Bisher ist unter anderem bekannt, dass etwa 80% des Gesamtbestandes an Faktor V im Plasma vorliegt und etwa 20%, teils in aktivierter Form, sich gespeichert in den Thrombozyten befinden. Die heutigen Erkenntnisse über die prozentuale Verteilung von plasmatischem und thrombozytärem Faktor V und die Quantifizierung beruhen auf den in 1982 publizierten Studien von Tracy et. al. Mit der hier vorgelegten Arbeit sollte eine auf diskriminierenden ELISA-Methoden basierende Quantifizierung des Faktor V erfolgen. Um plasmatischen und thrombozytären Faktor V quantitativ bestimmen zu können, wurden in der hier vorgelegten Arbeit vier Sandwich-ELISA entwickelt, welche durch die Kombination verschiedener Fänger- und Detektionsantikörper die unterschiedlichen Varianten des FV spezifisch erfassen sollten.

Unter Anwendung dieser ELISA-Verfahren wurde die Konzentration von FV sowohl in Plasmaproben als auch in Thrombozytenlysaten von gesunden Blutspendern bestimmt. Hierbei zeigten sich im Rahmen der Bestimmung von plasmatischem FV vergleichbare Messwerte unter Anwendung der vier verschiedenen ELISA-Verfahren, was deren Eignung zur Erfassung von plasmatischem FV prinzipiell bestätigte. Hier zeigte sich eine mittlere Konzentration von $3,83 \pm 0,23 \mu\text{g je ml Plasma}$.

Bei der Bestimmung von thrombozytärem Faktor V zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der erhaltenen Testergebnisse. So wurden, wie auch zu erwarten war, die höchsten Messwerte im Bereich von $0,1024 \mu\text{g je ml Lysat}$ (Standardabweichung 0,95) mit einem polyklonalen Testansatz erreicht (ELISA #2), welcher nicht in der Lage war zwischen den verschiedenen Formen des FV zu unterscheiden. Andererseits stand mit einer spezifisch die leichte Kette des FV fangenden und die schwere Kette des FV detektierenden Antikörperkonstellation ein Assay zur Verfügung (ELISA #3), der vornehmlich die nichtaktivierte Form des FV erfasste. Unter Anwendung dieses Testverfahrens wurde in den Lysatproben lediglich eine FV-Konzentration von $0,0189 \mu\text{g/ml}$ (Standardabweichung 0,088) ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen in Kombination auf, dass FV in Thrombozyten hauptsächlich in aktivierter Form vorliegt.

Des Weiteren zeigte sich, dass ein gegen die Aminosäuren 500-513 der schweren Kette des FV affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper nicht in der Lage war an aktivierten FV zu binden. Während hierbei die biochemischen Hintergründe nicht geklärt werden konnten, wurden diese Ergebnisse durch Bindungsanalysen mittels Bio-Layer-Interferometrie bestätigt. Zudem konnten mit einem weiteren ELISA (#4) ein Setting entwickelt werden, das unter Fangen der leichten Kette des FV einen polyklonalen Read-Out auch in Thrombozytenlysaten lieferte.

Das anteilige Vorkommen von Faktor V im Plasma und in den Thrombozyten wurde in dieser Studie mit 97% zu 3 % bestimmt. Auch konnten Erkenntnisse über den Aktivierungszustand des Faktor V im Thrombozyten gewonnen werden. Somit bilden die in dieser Arbeit vorgestellten ELISA-Tests die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, etwa bezüglich des Blutungsrisikos bei Patienten mit einem Faktor V Mangel.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Aktivierung von Faktor V	20
Abbildung 2: Prinzip der Herstellung des plättchenreichen Plasmas für die Gewinnung des Thrombozyten-Lysates	40
Abbildung 3: Messergebnisse der direkten ELISA unter Verwendung der vier monoklonalen Antikörper. Faktor V wurde in der Konzentration 5 µg/ml auf die Platte gegeben. Für jeden Antikörpereinsatz wurden jeweils die Konzentrationen 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/ml) verwendet	48
Abbildung 4: Biolayer-Interferometrie mit monoklonalen Antikörpern und Faktor V/ Faktor Va	49
Abbildung 5: Etablierte ELISA-Verfahren	52
Abbildung 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Faktor V Aktivität der Lysat- und Plasmaproben	56
Abbildung 7: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Plasmaprobenkonzentrationen sowie der Standardabweichungen bei der Anwendung in den ELISA 1 bis 4	57
Abbildung 8: Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Lysatprobenkonzentrationen sowie der Standardabweichungen bei der Anwendung in den ELISA 1 bis 4	58
Abbildung 9: Streudiagramm der Einzelwerte von Thrombozytenzahl und entsprechender Faktor V Aktivität in den Lysatproben	61
Abbildung 10: Darstellung der Aktivität der FV Proben im Streudiagramm. Aufgetragen sind jeweils Plasma- gegen Lysat-Aktivität der Probanden	61
Abbildung 11: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 1 gemessene FV-Konzentration der Proben	62
Abbildung 12: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 1 gemessene FV-Konzentration der Proben	63
Abbildung 13: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 2 gemessene FV-Konzentration der Proben	64
Abbildung 14: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 2 gemessene FV-Konzentration der Proben	64

Abbildung 15: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 3 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben	65
Abbildung 16: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 3 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben	66
Abbildung 17: Darstellung der FV-Aktivität der Plasmaproben gegen die im ELISA 4 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben	67
Abbildung 18: Darstellung der FV-Aktivität der Lysatproben gegen die im ELISA 4 gemessene FV-Konzentration der jeweiligen Proben	67

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beschreibung der verwendeten Antikörper.	40
Tabelle 2: Darstellung der Durchführung der vier ELISA-Varianten	53

8 Literaturverzeichnis

Acharya SS, Coughlin A, Dimichele DM. Rare Bleeding Disorder Registry: deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 248–256

Albagoush SA, Koya S, Chakraborty RK, Schmidt AE. *StatPearls*. Treasure Island (FL) 2022

Asselta R, Peyvandi F. Factor V deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 382–389

Asselta R, Tenchini ML, Duga S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 26–34

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, Sauvage F de, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004; 10: 64–71

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

Bakker HM, Tans G, Thomassen MC, Yukelson LY, Ebberink R, Hemker HC, Rosing J. Functional properties of human factor Va lacking the Asp683-Arg709 domain of the heavy chain. *J Biol Chem* 1994; 269: 20662–20667

Behnke O. Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *Anat Rec* 1967; 158: 121–137

Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2013a

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. Heidelberg: Springer Spektrum 2013b

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

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177–189

Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 227–234

BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–929

Bouchard BA, Chapin J, Brummel-Ziedins KE, Durda P, Key NS, Tracy PB. Platelets and platelet-derived factor Va confer hemostatic competence in complete factor V deficiency. *Blood* 2015; 125: 3647–3650

Bouchard BA, Meisler NT, Nesheim ME, Liu C-X, Strickland DK, Tracy PB. A unique function for LRP-1: a component of a two-receptor system mediating specific endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 638–644

Bouchard BA, Williams JL, Meisler NT, Long MW, Tracy PB. Endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes occurs via a clathrin-dependent, specific membrane binding event. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 541–551

Boujrad S, El Hasbaoui B, Echahdi H, Malih M, Agadr A. Déficit congénital en facteur V: à propos d'un cas. *Pan Afr Med J* 2017; 27: 182

Brandt E, Ludwig A, Petersen F, Flad HD. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev* 2000; 177: 204–216

Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 217–223

Broze GJ, Girard TJ. Factor V, tissue factor pathway inhibitor, and east Texas bleeding disorder. *J Clin Invest* 2013; 123: 3710–3712

Bukys MA, Orban T, Kim PY, Beck DO, Nesheim ME, Kalafatis M. The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII. *J Biol Chem* 2006; 281: 18569–18580

Camire RM. Rethinking events in the haemostatic process: role of factor V and TFPI. *Haemophilia* 2016; 22 Suppl 5: 3–8

Camire RM, Bos MHA. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1951–1961

Camire RM, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A, Tracy PB. Platelet-derived factor Va/Va Leiden cofactor activities are sustained on the surface of activated platelets despite the presence of activated protein C. *Blood* 1998a; 91: 2818–2829

Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood* 1998b; 92: 3035–3041

Cell Signaling Technology. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Overview | Cell Signaling Technology. Verfügbar unter <https://www.cellsignal.de/applications/elisa/elisa-overview> (Zugriffsdatum: 18.03.2022)

Chediak J, Ashenhurst JB, Garlick I, Desser RK. Successful management of bleeding in a patient with factor V inhibitor by platelet transfusions. *Blood* 1980; 56: 835–841

Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 2002; 296: 539–541

Chesney CM, Pifer D, Colman RW. Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 5180–5184

Church WR, Jernigan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, Knutson GJ, Nesheim ME, Mann KG, Fass DN. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 6934–6937

Ciavarella D, Lavallo E, Reiss RF. Coagulation factor activity in platelet concentrates stored up to 7 days: an in vitro and in vivo study. *Clin Lab Haematol* 1986; 8: 233–242

Coller BS, Seligsohn U, West SM, Scudder LE, Norton KJ. Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and alpha v beta 3 integrins in platelet protein trafficking. *Blood* 1991; 78: 2603–2610

Cramer E, Berger G. Immunoelectron microscopic changes of the platelet plasma membrane after activation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 172–177

Dahlbäck B. Pro- and anticoagulant properties of factor V in pathogenesis of thrombosis and bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* 2016; 38 Suppl 1: 4–11

Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor α , and protein S. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1241–1250

Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1004–1008

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106: 1604–1611

DocCheck Medical Services GmbH. ELISA - DocCheck Flexikon. Verfügbar unter <https://flexikon.doccheck.com/de/ELISA> (Zugriffsdatum: 18.03.2022)

Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* 2000; 96: 2469–2478

Drzymalski DM, Elsayes AH, Ward KR, House M, Manica VS. Platelet transfusion as treatment for factor V deficiency in the parturient: a case report. *Transfusion* 2019; 59: 2234–2237

Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabrilii P, Gavasso S, Rosing J, Castoldi E. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood* 2010; 115: 879–886

Engvall E. Perspective on the historical note on EIA/ELISA by Dr. R.M. Lequin. *Clin Chem* 2005; 51: 2225

Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 1986; 123: 86–94

Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1152–1160

Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 88: 1128–1134

Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 781857

Giampaolo A, Vulcano F, Macioce G, Mattia G, Barca A, Milazzo L, Ciccarelli C, Hassan HJ. Factor-V expression in platelets from human megakaryocytic culture. *Br J Haematol* 2005; 128: 108–111

Gould WR, Silveira JR, Tracy PB. Unique in vivo modifications of coagulation factor V produce a physically and functionally distinct platelet-derived cofactor: characterization of purified platelet-derived factor V/Va. *J Biol Chem* 2004; 279: 2383–2393

Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 191–204

Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 73–80

Haydon GB, Taylor DA. Microtubules in hamster platelets. *J Cell Biol* 1965; 26: 673–676

Hayward CP, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM, Moore JC, Bainton DF, Nesheim ME, Kelton JG, Côté G. Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *J Biol Chem* 1995; 270: 19217–19224

Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002; 88: 186–193

Hill-Eubanks DC, Parker CG, Lollar P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6508–6512

Hoekema L, Nicolaes GA, Hemker HC, Tans G, Rosing J. Human factor Va1 and factor Va2: properties in the procoagulant and anticoagulant pathways. *Biochemistry* 1997; 36: 3331–3335

Janus TJ, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA. Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* 1983; 22: 6269–6272

Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufman RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4846–4850

Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Shivdasani RA, Andrian UH von. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317: 1767–1770

Jurk K, Kehrel BE. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 1130–1135

Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten. *Internist (Berl)* 2010; 51: 1086, 1088-92, 1094

- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394: 690–694
- Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994; 269: 31869–31880
- Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 6800–6804
- Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Ronde H de, Briët E, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *The Lancet* 1993; 342: 1503–1506
- Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res* 2018; 122: 337–351
- Kowalska MA, Mahmud SA, Lambert MP, Poncz M, Slungaard A. Endogenous platelet factor 4 stimulates activated protein C generation in vivo and improves survival after thrombin or lipopolysaccharide challenge. *Blood* 2007; 110: 1903–1905
- Krishnaswamy S. Prothrombinase complex assembly. Contributions of protein-protein and protein-membrane interactions toward complex formation. *J Biol Chem* 1990; 265: 3708–3718
- Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med* 2011; 13: 1–16
- Kyrle PA, Eichinger S, Quehenberger P, Pabinger-Fasching I, Greinacher A, Lubenow N, Pötzsch B, Madlener K, Haas S. Venöse Thromboembolien. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 391–429
- Lak M, Sharifian R, Peyvandi F, Mannucci PM. Symptoms of inherited factor V deficiency in 35 Iranian patients. *Br J Haematol* 1998; 103: 1067–1069
- Langer HF, Gawaz M. Thrombozytenadhäsion und -aggregation. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 61–63

- Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005; 51: 2415–2418
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154: 485–490
- Madlener K, Pötzsch B. Hämostasesystem. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. Hämostaseologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 8–12
- Mancuso ME, Santagostino E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *Br J Haematol* 2017; 178: 209–219
- Mann KG, Hockin MF, Begin KJ, Kalafatis M. Activated protein C cleavage of factor Va leads to dissociation of the A2 domain. *J Biol Chem* 1997; 272: 20678–20683
- Mann KG, Nesheim ME, Hibbard LS, Tracy PB. The role of factor V in the assembly of the prothrombinase complex. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370: 378–388
- Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1945–1955
- Monković DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* 1990; 265: 17132–17140
- Müller J. Faktoren V und VIII. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. Hämostaseologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 182–189
- Nagahisa H, Nagata Y, Ohnuki T, Osada M, Nagasawa T, Abe T, Todokoro K. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation. *Blood* 1996; 87: 1309–1316
- Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; 254: 10952–10962

Nicolaes GA, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Partial glycosylation of Asn2181 in human factor V as a cause of molecular and functional heterogeneity. Modulation of glycosylation efficiency by mutagenesis of the consensus sequence for N-linked glycosylation. *Biochemistry* 1999; 38: 13584–13591

Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 530–538

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102: 449–461

Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987; 70: 475–483

Nolan E. 101 Tipps zur Fehlerbehebung bei ELISA. *Assay Genie*

Norstrøm EA, Steen M, Tran S, Dahlbäck B. Importance of protein S and phospholipid for activated protein C-mediated cleavages in factor Va. *J Biol Chem* 2003; 278: 24904–24911

Norstrøm EA, Tran S, Steen M, Dahlbäck B. Effects of factor Xa and protein S on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J Biol Chem* 2006; 281: 31486–31494

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: 2844–2853

Owen CA, Bowie EJ. Generation of coagulation factors V, XI, and XII by the isolated rat liver. *Haemostasis* 1977; 6: 205–212

OWREN PA. Parahaemophilia; haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor. *The Lancet* 1947; 1: 446–448

Pellequer JL, Gale AJ, Griffin JH, Getzoff ED. Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 448–461

Perdekamp MTG, Rubenstein DA, Jesty J, Hultin MB. Platelet factor V supports hemostasis in a patient with an acquired factor V inhibitor, as shown by prothrombinase and tenase assays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 593–597

Petrillo T, Ayombil F, Van't Veer C, Camire RM. Regulation of factor V and factor V-short by TFPI α : Relationship between B-domain proteolysis and binding. *J Biol Chem* 2021; 296: 100234

Pfahler S. Untersuchungen zur Rolle von thrombozytärem Faktor V in der Regulation der Gerinnungsaktivierung. Bonn: Universitäts- und Landesbibliothek Bonn 2022

Piovella F, Ascari E, Sitar GM, Malamani GD, Cattaneo G, Magliulo E, Storti E. Immunofluorescent detection of factor VIII-related antigen in human platelets and megakaryocytes. *Haemostasis* 1974; 3: 288–295

Polasek J. Procoagulant potential of platelet alpha granules. *Platelets* 2004; 15: 403–407

Preissner KT. Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 160–168

Prolytix. Anti-Human Factor V antibody | Prolytix. Verfügbar unter <https://www.goprolytix.com/product/anti-human-factor-v-antibody-5/> (Zugriffsdatum: 07.04.2023)

Qureshi AH, Chaoji V, Maignel D, Faridi MH, Barth CJ, Salem SM, Singhal M, Stoub D, Krastins B, Ogihara M, Zaki MJ, Gupta V. Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. *PLoS One* 2009; 4: e7627

Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 2002; 190: 7–20

Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN. Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry* 1990; 29: 2606–2611

Reininger AJ. Thrombusformation im Blutfluss. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 74–80

Ren M, Li R, Chen N, Pang N, Li Y, Deng X, Wang L, Luo M, Liu Y, Hao H, Liu Y, Sun H, Wu J. Platelet-Derived Factor V Is a Critical Mediator of Arterial Thrombosis. *J Am Heart Assoc* 2017; 6

Rosing J, Govers-Riemslog JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. *Haemostasis* 2001; 31: 241–246

Rosing J, Tans G. Factor V. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1997; 29: 1123–1126

Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120 Suppl 1: S5-9

Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289–297

Schneppenheim R, Budde U. Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS13. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 228–235

Shah NB, Duncan TM. Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *J Vis Exp* 2014: e51383

Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269: 18735–18738

Song JW, Um MR, Ahn HS, Hong CY. A case of congenital factor V deficiency. *J Korean Med Sci* 1987; 2: 179–182

Spiezia L, Radu C, Campello E, Bulato C, Bertini D, Barillari G, Angelis V de, Pradella P, Zanon E, Simioni P. Whole blood rotation thromboelastometry (ROTEM®) in nine severe

factor V deficient patients and evaluation of the role of intraplatelets factor V. *Haemophilia* 2012; 18: 463–468

Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, Diamond SL, Brass LF. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 2013; 121: 1875–1885

Steffel J, Lüscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC. Cyclooxygenase-2 inhibition and coagulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: S15–S20

Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells* 1989; 15: 23–47

Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol* 1984; 98: 748–760

Steppich BA, Ott I. Tissue Factor Pathway. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 130–157

Sun H, Yang TL, Yang A, Wang X, Ginsburg D. The murine platelet and plasma factor V pools are biosynthetically distinct and sufficient for minimal hemostasis. *Blood* 2003; 102: 2856–2861

Suzuki H, Murasaki K, Kodama K, Takayama H. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *Br J Haematol* 2003; 121: 904–912

Tabibian S, Shiravand Y, Shams M, Safa M, Gholami MS, Heydari F, Ahmadi A, Rashidpanah J, Dorgalaleh A. A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45: 523–543

Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 2012: 3–22

Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. The C-terminal region of the factor V B-domain is crucial for the anticoagulant activity of factor V. *J Biol Chem* 1998; 273: 16140–16145

- Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982; 60: 59–63
- Tran S, Norstrøm E, Dahlbäck B. Effects of prothrombin on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J Biol Chem* 2008; 283: 6648–6655
- Tranzer JP, Da Prada M, Pletscher A. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature* 1966; 212: 1574–1575
- Vadivel K, Kumar Y, Bunce MW, Camire RM, Bajaj MS, Bajaj SP. Interaction of factor V B-domain acidic region with its basic region and with TFPI/TFPI2: Structural insights from molecular modeling studies. *Int Biol Rev* 2017; 1
- Villoutreix BO, Dahlbäck B. Structural investigation of the A domains of human blood coagulation factor V by molecular modeling. *Protein Sci* 1998; 7: 1317–1325
- Vincent LM, Tran S, Livaja R, Benseid TA, Milewicz DM, Dahlbäck B. Coagulation factor V(A2440G) causes east Texas bleeding disorder via TFPI α . *J Clin Invest* 2013; 123: 3777–3787
- Vinnikov IA, Nawroth PP, Isermann B. Thrombomodulin-Protein-C-System und Protein Z. in: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 251.258
- Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986; 124: 324–334
- White JG. Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets. II. Changes in the dense tubular system and formation of an unusual inclusion in incubated cells. *Am J Pathol* 1968; 53: 447–461
- White JG, Conard WJ. The fine structure of freeze-fractured blood platelets. *Am J Pathol* 1973; 70: 45–56

White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 233–242

White JG, Escolar G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets* 1993; 4: 175–189

White JG, Krumwiede MD, Cocking-Johnson DJ, Escolar G. Dynamic redistribution of glycoprotein Ib/IX on surface-activated platelets. A second look. *Am J Pathol* 1995; 147: 1057–1067

Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S, Vane JR, Johnson RA, Morton DR, Kinner JH, Gorman RR, McGuire JC, Sun FF. The chemical structure of prostaglandin X (prostaglandin). *Prostaglandins* 1976; 12: 915–928

Wikipedia. 2022. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Verfügbar unter https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Enzyme-linked_Immunsorbent_Assay&oldid=219940095 (Zugriffsdatum: 18.03.2022)

Wikipedia. 2023. Bio- Layer- Interferometrie. Verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Bio-Layer-Interferometrie> (Zugriffsdatum: 05.02.2023)

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2839–2843

Wilson DB, Salem HH, Mruk JS, Maruyama I, Majerus PW. Biosynthesis of coagulation Factor V by a human hepatocellular carcinoma cell line. *J Clin Invest* 1984; 73: 654–658

Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 17838–17843

Yang Y, Xiao L, Chen N, Li Y, Deng X, Wang L, Sun H, Wu J. Platelet-derived factor V promotes angiogenesis in a mouse hind limb ischemia model. *J Vasc Surg* 2017; 65: 1180-1188.e1

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121–1132

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med Bernd Pötzsch für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für die Findung des Promotionsthemas und die Bereitstellung aller dafür benötigten Mittel und die Unterstützung bei der Umsetzung bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. biol.hom. Jens Müller, der mir jederzeit mit zahlreichen Tipps geholfen hat, dieses Projekt umzusetzen, und der für alle Herausforderungen eine Lösung gefunden hat. Die wissenschaftliche Begleitung war eine wichtige Stütze zur erfolgreichen Durchführung für mich.

Innerhalb des Instituts für exp. Hämatologie und Transfusionsmedizin der Uniklinik Bonn danke ich herzlich insbesondere Frau Simone Gasper, Frau Iris Neuerburg, Frau Dr. Nasim Shahidi-Hamedani und dem gesamten Team für die hervorragende Begleitung im Labor, für viele Tipps und Tricks und die netten Stunden der gemeinsamen Arbeit und Pausen.

Ich bedanke mich herzlich für die Unterstützung meiner Freunde, hervorzuheben hier Frau Carmen Hunzelar, Frau Isabel Rehbach und Herrn Maruan Saleh, die mir stets mit Rat, Tat, Formatierungshilfen und einer ausreichenden Portion Humor zur Seite standen.

Ich kann den Dank an meine Familie nicht in Worte fassen, ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute stehe. Danke an meine liebe Mama und meinen lieben Papa, ich bin glücklich, mit euch alle Höhen und Tiefen teilen zu können, danke, dass ihr immer für mich da seid.

Der Dank gilt auch meinen Großeltern, die mich als Menschen tief beeindruckten und mir immer gezeigt haben, wie wichtig die Familie ist.

Danke lieber Marco, du hast mich auch mit diesem Projekt mit deiner Liebe stets unterstützt. Danke für deine Geduld, dein Verständnis und deine Liebe.

Danke an meine Lehrer meiner Schulzeit, die mich selbstständiges und kritisches Denken gelehrt haben und meine Freude und Neugier am Lernen gefördert haben.