

**Einfluss der Plasmamatrix auf das pharmakodynamische Wirkprofil von
aktiviertem Protein C -Aptameren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Moritz Friedo Meyer
aus Engelskirchen

2011

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Pötzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ludwig

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.07.2011

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin,
Direktor Prof. Dr. Johannes Oldenburg, Universitätsklinik der Rheinischen Friedrichs-Wilhelms-
Universität Bonn

Für meine liebe Familie, Ruth und Joachim, Elli, Ise und Joel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	12
1.1 EINFÜHRUNG.....	12
1.2 GRUNDLAGEN.....	14
1.2.1 <i>Blutgerinnung: Physiologie</i>	14
1.2.1.1 Einleitung.....	14
1.2.1.2 Primäre Hämostase.....	14
1.2.1.3 Sekundäre Hämostase.....	17
1.2.1.4 Fibrinolyse.....	20
1.2.1.5 Hemmende Faktoren des Gerinnungsablaufs.....	21
1.2.2 <i>Das Protein C-System</i>	22
1.2.2.1 Einleitung.....	22
1.2.2.2 Aktivierung des Protein C.....	23
1.2.2.3 Wirkung.....	25
1.2.2.4 Störungen des Protein C-Systems.....	26
1.2.2.5 Therapeutische Verwendung von APC.....	27
1.2.2.6 Potentielle therapeutische Anwendung von APC-Inhibitoren.....	28
1.2.3 <i>Störungen des Gerinnungssystems</i>	29
1.2.3.1 Hereditäre Störungen des Gerinnungssystems.....	29
1.2.3.2 Erworben Störung des Gerinnungssystems-Sepsis.....	32
1.2.4 <i>Aptamere</i>	34
1.2.4.1 Einleitung.....	34
1.2.4.2 Herstellungsverfahren SELEX und Modifizierung.....	35
1.2.4.3 Aptamere in der Therapie und Diagnostik.....	38
1.2.4.4 Aptamere gegen APC.....	39
1.3 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG.....	41
1.3.1 <i>Zielsetzung</i>	41
1.3.2 <i>Fragestellung</i>	41
2 Materialien.....	43
2.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	43
2.2 VERWENDETE REAGENZIIEN.....	43
2.3 VERWENDETE MATERIALIEN.....	45
2.4 VERWENDETE GERÄTE.....	45

3 Methodik	47
3.1 ALLGEMEINE VERSUCHSPRINZIPIEN.....	47
3.1.1 Einleitung	47
3.1.2 Messung der Gerinnungszeiten.....	48
3.1.3 Bestimmung der Thrombingenerierung	48
3.2 SPEZIFISCHE VERSUCHSPRINZIPIEN.....	49
3.2.1 <i>IC₅₀-Bestimmungen der Aptamere</i>	49
3.2.1.1 Einleitung	49
3.2.1.2 Gerinnungszeitmessung	50
3.2.1.3 Fluorogenes Testsystem.....	51
3.2.1.4 Datenanalyse.....	52
3.2.2 <i>Stabilitätsbestimmung der Aptamere</i>	53
3.2.2.1 Einleitung	53
3.2.2.2 Gerinnungszeitmessung	53
3.2.2.3 Fluorogenes Testsystem.....	54
3.2.2.4 Datenanalyse.....	55
3.2.3 <i>Thrombingenerierung</i>	55
3.2.3.1 Einleitung	55
3.2.3.2 Spezielles Testprinzip	56
3.2.3.3 Datenanalyse.....	56
4 Ergebnisse	58
4.1 <i>IC₅₀-BESTIMMUNGEN DER APTAMERE</i>	58
4.1.1 <i>IC₅₀-Bestimmung in Citratplasma</i>	58
4.1.2 <i>IC₅₀-Bestimmung in Heparinplasma</i>	60
4.1.3 <i>IC₅₀-Bestimmung in Hirudinplasma</i>	63
4.1.4 <i>IC₅₀-Bestimmung in Hirudinvollblut</i>	65
4.1.5 <i>IC₅₀-Bestimmung in Hirudinplasma über das fluorogene Testsystem</i>	66
4.2 <i>STABILITÄT DER APTAMERE IN PLASMA</i>	70
4.2.1 <i>Stabilität in Citratplasma</i>	70
4.2.2 <i>Stabilität in Heparinplasma</i>	72
4.2.3 <i>Stabilität in Hirudinplasma</i>	75
4.2.4 <i>Stabilität in Hirudinplasma über das fluorogene Testsystem</i>	78
4.3 <i>THROMBINGENERIERUNG</i>	80
4.3.1 <i>Thrombomodulinwirkung in Plasma</i>	80
4.3.2 <i>Aptamerwirkung in TM-gespicktem Poolplasma</i>	81
4.3.3 <i>Aptamerwirkung in Faktor VIII-Mangelplasma</i>	83
4.3.4 <i>Aptamere im Vergleich</i>	86

5 Diskussion.....	88
5.1 ALLGEMEINE DISKUSSION	88
5.2 AUSBLICK	96
6 Zusammenfassung.....	98
7 Literaturverzeichnis.....	100
Danksagungen	113
Lebenslauf.....	114

Abkürzungsverzeichnis

3D	3dimensional
α_2 -M	<i>α_2-macroglobulin</i>
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter (10^{-6})
μ M	Mikromolar
®	Registered
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
AML	Akute myeloische Leukämie
APC-Resistenz	Resistenz gegen aktiviertes Protein C
APC	Aktiviertes Protein C
APTT	Partielle Thromboplastinzeit
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
AT	Antithrombin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca^{2+}	Calciumion
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	Cytosin/Thymin
Da	Dalton
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPCR	<i>Endothelian protein C rezeptor</i>
ETP	Endogenes Thrombinbildungspotential
F V/ F VIII	Faktor V/ Faktor VIII

FG	Fibrinogen
Gla	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GP	Glykoprotein
HCL	Salzsäure
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonicacid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMWK	<i>High molecular weight kininogen</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IE	Internationale Einheit
Il	Interleukin
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kcal	Kilokalorien
KHK	Koronare Herzkrankheit
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
M	Molar
ml	Milliliter (10 ⁻³)
mM	Millimolar
Mg ²⁺	Magnesiumion
min	Minuten
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹)
MMP	<i>Matrix metalloproteinasis</i>
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NMH	Niedermolekulares Heparin
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
O	Sauerstoff

PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAR-1	<i>protease activated receptor 1</i>
PCI	Protein C-Inhibitor
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PC	Protein C
PCI	Protein C-Inhibitor
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PL	Phospholipide
pM	Picomolar (10 ⁻¹²)
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuklease
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
Ser	Serin
SERPIN	Serinproteasen-Inhibitoren
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i>
T	Thrombin
TF	<i>Tissue Factor</i>
Thr	Thyreonin
TSR	Thrombin-sensitive-Region
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
t-PA	<i>Tissue type plasminogen activator</i>
Tris/HCL	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrchlorid
TZ	Thrombozyt
UFA	Unfraktioniertes Heparin
u-PA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
vWS	Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom

1 Einleitung

1.1 Einführung

Ohne das Hämostasesystem wäre ein Überleben bei nicht unerheblichen Gefäßverletzungen nicht möglich. Es verhindert einen Blutverlust, der die Gefahr eines Volumenmangelschocks birgt. Die Gerinnung wird in die primäre und sekundäre Hämostase eingeteilt, wobei in vivo aber keine strikte Trennung besteht. Die primäre Hämostase ist vor allem durch die Wirkung der Thrombozyten gekennzeichnet. Diese werden durch nach der Verletzung aus der Gefäßwand freigesetzte Stoffe aktiviert. Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus dem Thrombozyten werden weitere Thrombozyten hinzugezogen und es wird so ein Pfropf gebildet, der die Wundstelle initial abdeckt.

Die sekundäre Hämostase besteht aus plasmatischen Gerinnungsfaktoren, v.a. Serinproteasen, die kaskadenartig durch Proteolysevorgänge aktiviert werden. Im letzten Schritt der Gerinnungskaskade wird durch Thrombin Fibrinogen zu Fibrin proteolytisch gespalten. Dadurch wird der Thrombozytenpfropf weiter verfestigt.

Die Gerinnung sollte immer mit der gleichzeitig ablaufenden Fibrinolyse, in der Fibrinthromben wieder lokal aufgelöst werden, im Gleichgewicht stehen, da ansonsten je nach Überwiegen eines Systems die Gefahr einer Thrombose besteht oder schwere Blutungen entstehen können.

Die mit einer Inzidenz von 1:5000 auftretende Hämophilie A basiert auf einem Mangel an Faktor VIII und zeigt in seiner klinischen Ausprägung die Folgen eines Defekts in der Blutgerinnung auf. Aktivierter Faktor VIII spielt eine große Rolle im Ablauf des intrinsischen Gerinnungswegs als Cofaktor des aktivierten Faktors IX innerhalb des Tenase-Komplexes (Witt und Dörner, 2003). Eingeteilt wird die Hämophilie in 3 Schweregrade. Unter 1%-Restaktivität des Faktors VIII wird sie als schwer, zwischen 2-5% als moderat und zwischen 6-25% als mild eingestuft (Klinge et al., 2002). Es kommt zu Einblutungen in Gelenke und Muskeln und häufig kommt es bei hohem Schweregrad zu lebensgefährlichen Blutungen (Pötzsch und Madlener, 2002).

Zur Behandlung der Hämophilie leisten z.T. rekombinant hergestellte Faktor-VIII-Konzentrate einen wichtigen Beitrag zur Verminderung des Nachblutungsrisikos. Jedoch besteht bei dieser Therapie das Problem, dass bis zu 30% der Hämophiliepatienten durch die Faktor-VIII-Gabe

inhibitorische Antikörper gegen den Faktor VIII ausbilden, wodurch diese Konzentrate unwirksam werden können (Bishop und Lawson, 2004).

In vivo gibt es darüber hinaus Stoffe, die gezielt regulatorisch in den Gerinnungsablauf eingreifen können und so zu einer Verlängerung oder einer Verkürzung der Gerinnungszeit führen. Ein wichtiges hemmendes System zur Erhaltung der Liquidität des Blutes ist das Protein C-System, dessen wichtigster Bestandteil das Vitamin K abhängige Protein C ist (Dahlbäck, 2005; Esmon, 2003). Es wird von einem Komplex aktiviert der aus Thrombin, Thrombomodulin und dem endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) besteht. Über das APC werden, unter Mithilfe des Cofaktors Protein S und von Ca^{2+} -Ionen, die Gerinnungsfaktoren VIIIa und Va inaktiviert, so dass die Gerinnungszeit verlängert wird. Das APC besitzt auch antiapoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften, welche man sich in der medikamentösen Behandlung der schweren Sepsis mit Multiorganversagen durch rekombinant hergestelltes APC (Drotrecogin Alpha, XIGRIS®) zu Nutze macht.

An der Universität Bonn wurden in einem Gemeinschaftsprojekt des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin und des Kekulé Instituts für Organische Chemie und Biochemie DNA-Aptamere identifiziert, welche spezifisch an APC binden (Salehi, 2007). Aptamere sind einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, welche mit hoher Affinität und Spezifität an Proteine zu binden vermögen und deren Aktivität hemmen können.

Aus diesem Grund erscheint es möglich, über die Aptamere die Aktivität von APC im Plasma zu bestimmen, was bis jetzt nur begrenzt möglich war (Liaw et al., 2003).

Neben einem möglichen therapeutischen Einsatz bei Hämophilie A-Patienten (Butenas und Mann, 1998; De Nanteuil, 2006) ist der Einsatz der Aptamere als Gegenmittel (Antidot) bei Überdosierung des rekombinant hergestellten APCs (XIGRIS®) möglich.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Blutgerinnung: Physiologie

1.2.1.1 Einleitung

Durch die Blutstillung (Hämostase) schützt sich der Körper bei Gewebsverletzungen vor Blutverlusten. Ein komplexes Zusammenspiel von *vaskulären*, *zellulären* und *plasmatischen* Komponenten ermöglicht die Ausbildung eines Blutgerinnsels, das den Gefäßdefekt verschließt. Die vaskuläre Komponente, die über die Blutgefäßwand vermittelt wird und die zelluläre Komponente, für die vor allem die Thrombozyten verantwortlich sind, werden auch als *primäre Hämostase* bezeichnet. Unter der *sekundären Hämostase* wird der plasmatische Anteil der Gerinnung verstanden, der über eine komplexe Gerinnungskaskade verläuft. Die Einteilung in primäre und sekundäre Hämostase ist allerdings rein didaktischer Natur, da die Systeme nicht getrennt voneinander, sondern gleichzeitig ablaufen und viele Wechselwirkungen untereinander stattfinden (Witt und Dörner, 2003).

Nach Verschluss des Defektes bedarf es zudem eines Systems, durch die Thromben wieder aufgelöst werden können. Dieses System bezeichnet man als *fibrinolytisches System* (Cesarmann-Maus und Hajjar, 2005).

Das fibrinolytische System und das Hämostasesystem stehen in einem Gleichgewicht, doch können genetisch angeborene oder erworbene Störungen dazu führen, dass ein System gegenüber dem anderen System dominiert. So kann es einerseits zu einer verstärkten Gerinnung mit einer erhöhten Thrombosegefahr kommen, andererseits muss mit einer erhöhten Blutungsneigung gerechnet werden (Witt und Dörner, 2003).

1.2.1.2 Primäre Hämostase

Die vaskulären und die zellulären Komponenten prägen die primäre Hämostase. Nach der Verletzung eines Gewebeareals, bei der Gefäße betroffen sind, werden glatte Muskelzellen der verletzten Gefäße (Arterien, Arteriolen, Kapillaren) durch vasokonstriktorische Stoffe aktiviert und verengt. Gleichzeitig setzen die Gefäßwand und die Thrombozyten (TZ) Stoffe wie Serotonin, Thromboxan A₂ und Katecholamine frei (Witt und Dörner, 2003). Durch die resultierende Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit werden die zelluläre und die plasmatische Gerinnung unterstützt.

Die scheibenförmigen Thrombozyten mit einem Durchmesser von ca. 3,6 µm und einer Dicke von ca. 0,9 µm stehen im Zentrum der primären Blutgerinnung. Sie zirkulieren durch den Blutkreislauf, bevorzugt in der Nähe des Endothels, ohne sich allerdings daran anzuheften (Kehrel, 2003).

Durch einen im Verletzungsvorgang entstandenen Endothelschaden kommt es zu einem Kontakt der Thrombozyten mit subendothelialelem Gewebe, was eine Anhaftung der Thrombozyten (*Thrombozytenadhäsion*) an das Endothel zur Folge hat (siehe Abb. 1). Die Thrombozyten erkennen die Adhäsionsproteine im freigelegten Endothel über spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (*Membranglykoproteine*) und decken den Gefäßdefekt ab. Der von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisierte *Von-Willebrand-Faktor* wird an das Plasma abgegeben und spielt eine entscheidende Rolle als Intermediärmolekül für die Bindung zwischen den Rezeptoren der Thrombozyten (v.a. Glykoprotein Ib/V/IX-Komplex) und den Komponenten des Endothels (Ruggeri, 2003). Unter statischen Bedingungen (offene Wunde) können Thrombozyten auch direkt über Glykoproteine (GP Ia/IIa) an aus der Extrazellulärmatrix stammendes Kollagen binden (Kehrel, 2003). Bei der oben beschriebenen Adhäsion an das Endothel kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten (George, 2000). Das Signal wird über mehrere bekannte Kaskaden in die Zelle geleitet (*outside-in-signalling*), die einen Gestaltwandel (*shape change*) vollziehen und von ihrer Scheibenform in eine Kugelform übergehen (siehe Abb. 1). Weitere Aktivatoren der Thrombozyten sind Thrombin, ADP, Thromboxan A₂, Adrenalin, MMP₂, Serotonin, Immunkomplexe, Komplementfaktoren, Vasopressin und Plasmin (Kehrel, 2003). Zusätzlich bilden sie zytoplasmatische Fortsätze aus, die als *Pseudopodien* bezeichnet werden.

Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Ausschüttung unterschiedlicher Substanzen aus den intrazellulär gelegenen Granula. Wichtige Stoffe sind ADP, Katecholamine, Serotonin, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Thromboxan A₂, Plättchenfaktor 4, β-Thromboglobulin und Thrombospondin. In einer Kettenreaktion werden durch diese freigesetzten Stoffe zunehmend Thrombozyten rekrutiert und aktiviert (Weiss und Jelkmann, 2000).

An den Thrombozytenoberflächen werden Phospholipide verfügbar, an die Komponenten der plasmatischen Gerinnung binden können. Ein wichtiges Glykoprotein ist das GP IIb/IIIa, an das Fibrinogen-Moleküle und der Von-Willebrand Faktor binden können (siehe Abb. 1). Durch die Thrombozytenaktivierung ändert der Rezeptor GP IIb/IIIa seine Konformation (*inside-out-*

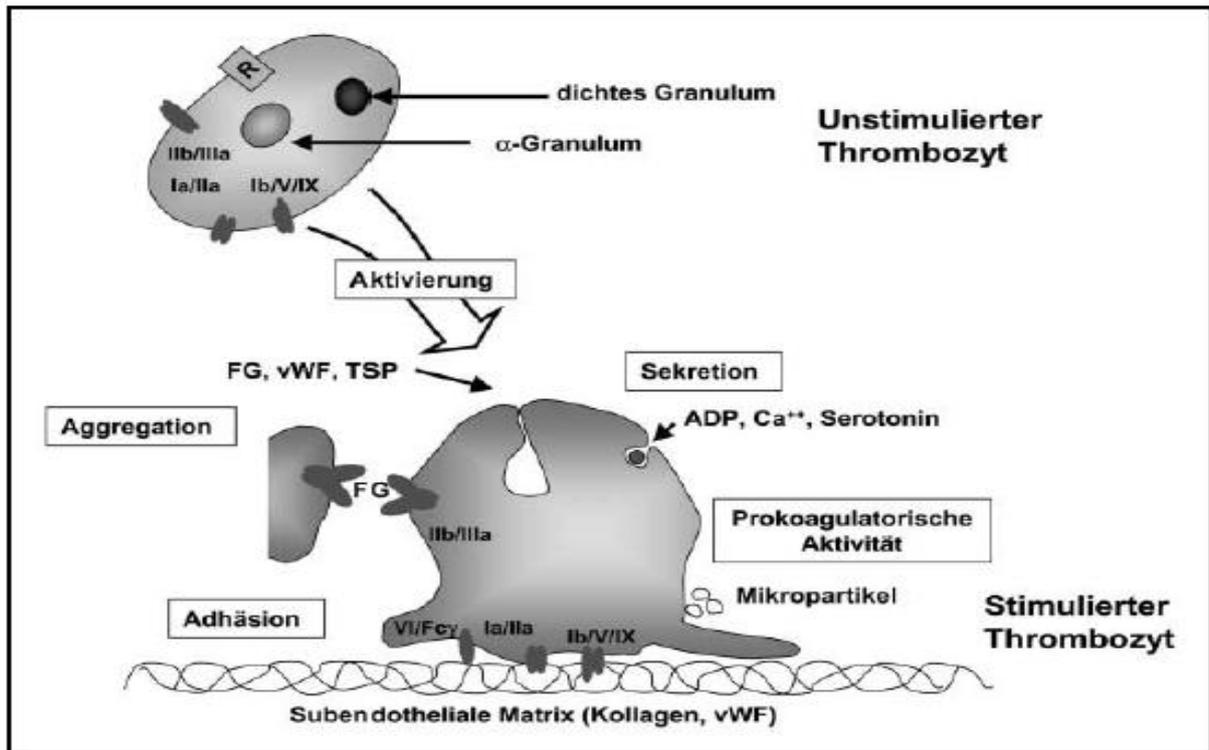


Abb. 1: Ablauf der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Über den Von-Willebrand-Faktor (vWF) kann eine Bindung zwischen dem Glykoprotein 1b/V/IX (GP 1b/V/IX), den Thrombozyten und der freiliegenden subendothelialen Matrix hergestellt werden. Bei Einwirkung nur geringer Scherkräfte binden Plättchen direkt über das Glykoprotein Ia/IIa (GP Ia/IIa). Die Thrombozyten werden durch den Adhäsionsvorgang stimuliert und aktiviert und verändern ihre Gestalt (shape change). Der Glykoproteinrezeptorkomplex IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) bindet Fibrinogen (FG) und ermöglicht so eine Aggregation. Das aktivierte Plättchen setzt ADP, Calcium und Serotonin frei. TSP= Thrombospondin (Kehrel, 2003)

signalling) (Shattil et al., 1994), so dass die Affinität zu Fibrinogen um mehrere Zehnerpotenzen steigt. Über die Bindung der brückenbildenden Komponenten Fibrinogen und dem Von-Willebrand-Faktor an GP IIa/IIIb (Coller, 1992) kommt es zur *Thrombozytenaggregation* und somit zur Vergrößerung des primären Pfropfes. Von dem so genannten *weißen Thrombus*, der noch wenig stabil ist, entwickelt sich der schwer auflösbare *rote Pfropf* durch Einbeziehung von Leukozyten und Erythrozyten. Hierdurch wird die verletzte Stelle abgedeckt (Pötzsch und Madlener, 2002).

Nach 1-3 Minuten findet so im Normalfall durch die primäre Hämostase eine vorläufige Persistenz der Blutung statt (Weiss und Jelkmann, 2000).

1.2.1.3 Sekundäre Hämostase

Schon während des Ablaufs der primären Hämostase beginnt ebenfalls die plasmatische Gerinnung. Am Ende der komplexen Gerinnungskaskade, die in *Abbildung 2* dargestellt wird, wird Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt, das für eine mechanische Stabilität des gebildeten Thrombus sorgt. Die Gerinnungskaskade besteht aus plasmatischen Gerinnungsfaktoren, welche zum größten Teil in der Leber gebildet werden. Sie enthalten sehr häufig in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Serin und werden deshalb als *Serinproteasen* bezeichnet (Witt und Dörner, 2003). Die Gerinnungsfaktoren werden als inaktive Formen (*Proenzyme*) durch das Blut transportiert und nach Bedarf gezielt an Ort und Stelle aktiviert.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Aktivierungswege: den *extrinsischen* und den *intrinsischen Aktivierungsweg*. Beide Aktivierungswege münden, wie in *Abbildung 2*, gezeigt über den Faktor X in die zentrale Reaktion, in die Aktivierung von Prothrombin ein.

a. Die extrinsische Aktivierung

Die innerhalb von Sekunden ablaufende extrinsische Aktivierung erfolgt primär durch die Entstehung des Gewebethromboplastin-Faktor VIIa Komplexes am Verletzungsort (Morrissey, 2001). Das integrale Membranprotein *Gewebethromboplastin* (Tissue Factor, TF) befindet sich vorrangig im subendothelialen Gewebe. Es kann auch von Monozyten und Endothelzellen gebildet werden und befindet sich in niedriger Konzentration im Blut. Durch eine Verletzung des Endothels kommen der subendotheliale Tissue Factor und der Vitamin K-abhängige Faktor VII in Kontakt (Osterud und Bjorklid, 2006). Hierdurch kommt es bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden durch membrangebundene Komplexbildung zur Aktivierung des Faktors X (siehe Abb. 2). Die negativ geladenen Phospholipide vermitteln zwischen den Komponenten als reaktive Oberfläche (Ruf et al., 1991).

Der Faktor VIIa/TF-Komplex aktiviert darüber hinaus auch Faktor IX zu IXa (siehe Abb. 2). Diese Interaktion mit dem Endpunkt des intrinsischen Aktivierungswegs wird als *Amplifier Loop* (Verstärkerschleife) bezeichnet. Die extrinsische Gerinnungsaktivierung kann also, vor allem bei niedriger Konzentration des Tissue Factors, über den Amplifier Loop verstärkt werden (Hemker et al., 2003). Die Faktoren VIII, IX und XI aus der intrinsischen Gerinnungskaskade werden so in den Gerinnungsablauf miteinbezogen. Die Folge ist eine zusätzliche Aktivierung des Faktors X.

Der Faktor VIII beteiligt sich am Gerinnungsvorgang, in dem er den Faktor IXa, Phospholipide und Ca^{2+} -Ionen komplexiert (*Endogene Tenase*).

b. Die intrinsische Aktivierung

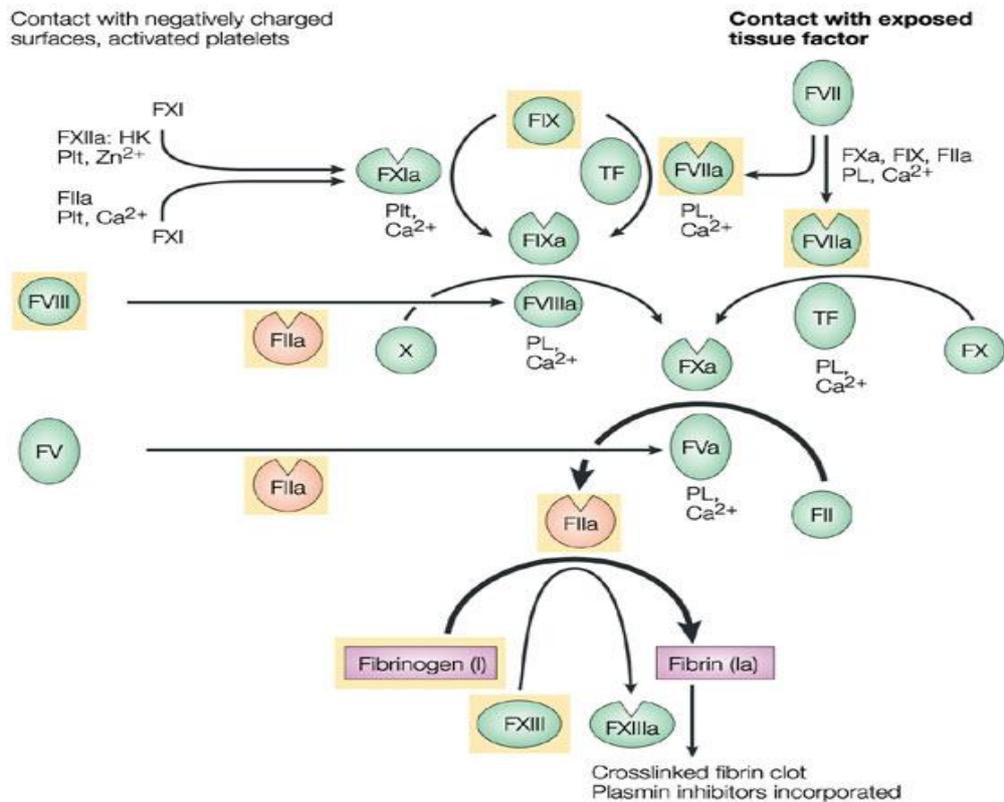
Zur Auslösung des innerhalb von Minuten aktiven intrinsischen Gerinnungssystems ist die Aktivierung des sog. *Hageman-Faktors* (Gerinnungsfaktor XII) durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen von Bedeutung, wie z.B. Glas oder Kaolin (Furie und Furie, 1988). Nach heutiger Erkenntnis stellt der intrinsische Gerinnungsweg ein Relikt der Phylogenese dar, da ein Mangel an den Reaktion auslösenden Stoffen nicht zu einer Blutungsneigung führt.

Der aktivierte Faktor XII führt zu einer Aktivierung des Prekallikreins zu Kallikrein, welches wiederum den Faktor XII aktiviert. Während ein Fragment des Faktors XIIa das Kallikrein-Kinin-System beeinflusst, führt ein anderes Fragment zur Aktivierung des Faktors XI unter Zuhilfenahme des Fitzgeraldfaktors (HMWKG) (Witt und Dörner, 2003).

Der nächste Reaktionsschritt ist die Aktivierung des Faktors IX durch Faktor XIa (siehe Abb. 2). Auch in dieser Reaktion bildet sich aus Faktor IXa, Ca^{2+} -Ionen, negativ geladenen Phospholipiden und Faktor VIIIa ein Komplex (*Endogene Tenase*) welcher Faktor X aktiviert. Hierbei spielt der aktivierte Faktor VIII (FVIIIa) eine besondere Rolle, da er nicht als Enzym fungiert, sondern die Reaktion als Cofaktor entscheidend beschleunigen kann.

Der aus dem intrinsischen oder extrinsischen Aktivierungsweg gebildete Faktor Xa benötigt, zur Unterstützung seiner Reaktion, Ca^{2+} -Ionen, Phospholipide und den aktivierten Faktor V (FVa). Hierdurch ist es möglich, Prothrombin zu Thrombin zu konvertieren (Di Cera, 2003) (siehe Abb. 2). Faktor V besitzt ebenfalls keine enzymatische Aktivität.

Die zentrale Protease im Gerinnungssystem, das *Thrombin*, besitzt einige wichtige Funktionen. Zu den Aufgaben des Thrombins gehören nicht nur die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, sondern auch die Aktivierung der vorstehend beschriebenen Cofaktoren V und VIII, sowie von Faktor XIII, die Aktivierung von Proteins C und die Unterstützung der Thrombozyten-Aggregation. Tatsächlich gilt Thrombin als der stärkste physiologische Agonist für die Aggregation und die Aktivierung der Plättchen (Kaiser, 1999). Das Enzym ist in der Lage durch Systeme positiver und negativer Rückkopplungen seine eigene Bildung und Hemmung zu regulieren.



Nature Reviews | Drug Discovery

Abb. 2: Aktivierungswege der sekundären Hämostase (Bishop und Lawson, 2004). PL = Phospholipide, F = Faktor

Die Kaskade wird vervollständigt durch die Umwandlung von *Fibrinogen* zu *Fibrin*, das als Polymer unlöslich ist. Der lose Thrombozytenpfropf gewinnt durch die Vernetzung des Fibrins an Festigkeit (Pötzsch und Madlener, 2002).

Fibrin zirkuliert im Blut als Dimer. Nur die polymere Faserform des Fibrins ist unlöslich. Durch Thrombin werden jeweils an den beiden langen Enden A- α und B- β des Fibrinogens die Fibrinopeptide A und B abgespalten, wodurch das Fibrin seine Konformation ändert. In der Folge ist eine End-zu-End-Verkettung mit anderen Fibrinmonomeren möglich. Im nächsten Schritt wird der lösliche Fibrinkomplex, durch die Transglutaminase Faktor XIIIa und die gleichzeitige Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen, zu einem unlöslichen Komplex (Polymer) mit kovalenten Bindungen umgewandelt.

1.2.1.4 Fibrinolyse

Auch die Fibrinolyse ist ein komplexer Vorgang in dem das in der Hämostase entstandene Fibringerinnsel wieder aufgelöst werden kann. Dies ist besonders wichtig um den Blutfluss offenzuhalten und intravasale Thrombenbildungen zu unterdrücken. Hierbei nimmt das aus der Leber stammende Enzym *Plasmin* eine tragende Rolle ein. Plasmin, das eine hohe Affinität zu Fibrin besitzt, ist eine Endopeptidase, die Fibrin auflöst, indem sie lösliche Peptide hydrolytisch abspaltet. Durch eine Aktivierung wird aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen zu Plasmin konvertiert. Aktivatoren dieser Reaktion sind der in Endothelzellen gebildete *tissue type plasminogen activator* (t-PA) und die vor allem in der Niere und im Urogenitaltrakt vorherrschende *Urokinase* (u-PA). Ein Überblick über die Zusammenhänge der einzelnen Komponenten in der Fibrinolyse ist in *Abbildung 3* dargestellt. Bei der sogenannten Lyse-Therapie können t-PA und u-PA therapeutisch genutzt werden, um Thromben bei einem thrombotischen Ereignis aufzulösen (Witt und Dörner, 2003).

Bei der Inaktivierung wird die Gamma-Kette des Fibrins durch Plasmin gespalten und es entstehen Spaltprodukte, die als *D-Dimere* bezeichnet werden. Sie weisen spezifisch auf eine Gerinnungsaktivierung und die Aktivität von Plasmin hin (Witt und Dörner, 2003).

Zu den hemmenden Faktoren der Fibrinolyse zählen α_2 -Antiplasmin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, Inter- α -Trypsin Inhibitor, Antithrombin und *Plasminogen Aktivator Inhibitor* (PAI-1). PAI-1 bindet den tissue type plasminogen activator (t-PA) und die Urokinase (u-PA) (siehe Abb. 3) zu einem Komplex und führt auf diese Weise zu einer effektiven Hemmung der Fibrinolyse (Holly, 2007). Die Synthese des Glykoproteins PAI-1 findet vermehrt in durch eine Verletzung aktivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen statt. Ein großer Anteil wird jedoch von den aktivierten Thrombozyten sezerniert (Yamamoto et al., 2005). Die Folge ist eine vorzeitige Unterbindung der Lyse des Fibrins im Verletzungsareal. Aktiviert werden kann PAI-1 auch über Insulin, Proinsulin-like-molecules, Glukose und VLDL-Triglyceride (Holly, 2007).

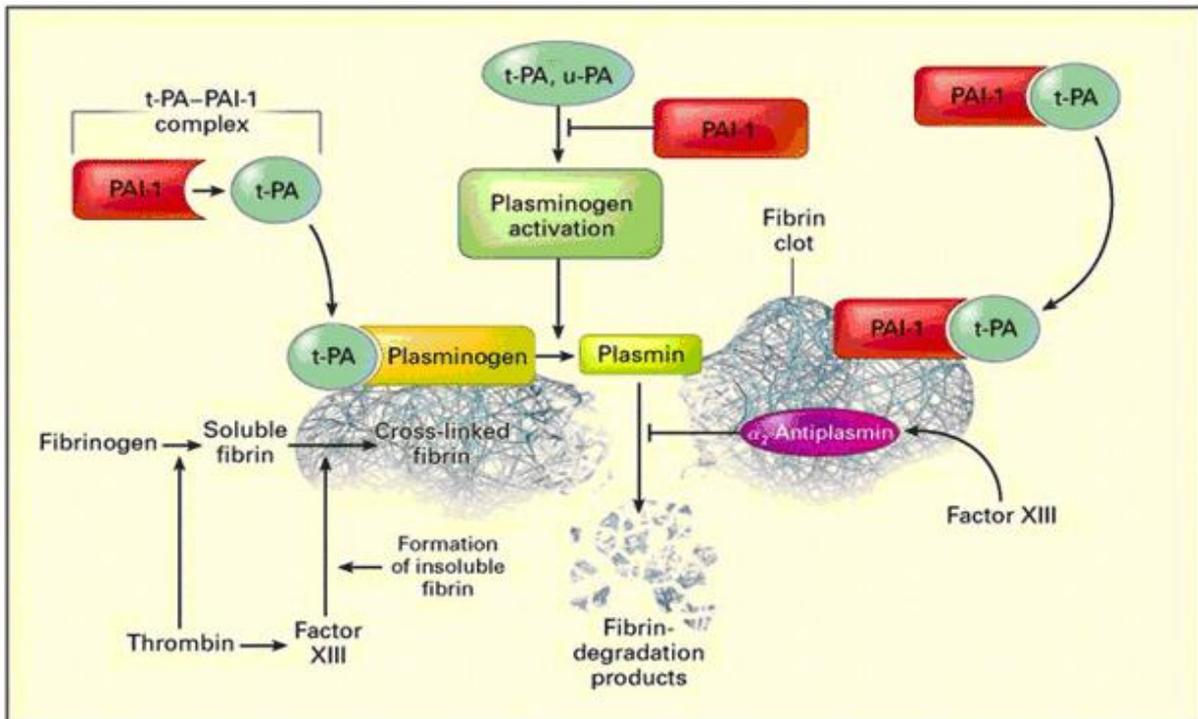


Abb. 3: Mechanismus der Fibrinolyse und Interaktion mit der Blutgerinnung (Holly, 2007). t-PA = tissue type plasminogen activator, PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, u-PA = Urokinase

1.2.1.5 Hemmende Faktoren des Gerinnungsablaufs

Um Gerinnungsvorgänge im gesunden Gewebe zu verhindern, bedarf es regulatorisch eingreifender, hemmender Faktoren. Die primäre Hämostase kann initial durch eine Unterbindung der Anheftung und durch eine unterdrückte Aktivierung der Thrombozyten gehemmt werden (Lüllmann und Mohr, 1999). Zu den wichtigsten antikoagulatorisch wirkenden Systemen der sekundären Hämostase können das Antithrombin-Heparin-System und das in dem nachfolgenden Kapitel beschriebene Protein C-System gezählt werden.

Das zu der Gruppe der sogenannten Serinproteasen-Inhibitoren (kurz SERPIN) gehörende Antithrombin (AT) besitzt eine besondere Affinität zu Faktor Xa und Thrombin. Dabei verbindet sich das AT mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor zu einem inaktiven Komplex. AT alleine hat nur eine schwache und langsame Wirkung. Lagert sich allerdings Heparin an die positiv geladenen Lysin-Gruppen des AT, wird die Reaktionsdauer verkürzt und die Wirkung verstärkt sich um das 700-1000fache (Weiss und Jelkmann, 2000).

Das Polysaccharid Heparin ist ein wichtiger Hemmstoff der plasmatischen Gerinnung und wird einerseits im Körper gebildet, kann andererseits auch dem Körper zugeführt werden. In vivo befindet es sich zum Großteil in Granula von basophilen Granulozyten und Mastzellen. Reich an Heparin sind die Organe Leber, Lunge und der Gastrointestinaltrakt. Für die Hemmung des Faktors Xa reicht es aus, dass das Heparin lediglich das AT bindet (*Niedermolekulares Heparin*, NMH) (Weitz, 1997). Im Gegensatz dazu ist ein längeres Heparinmolekül (*Unfraktioniertes Heparin*, UFA) notwendig um Thrombin zu inhibieren, da hierzu gleichzeitig eine Bindung an Thrombin und an AT erfolgen muss. Zusätzlich hat das Heparin auch eine hemmende Wirkung auf die Thrombozytenadhäsion und Aggregation (Lüllmann und Mohr, 1999).

1.2.2 Das Protein C-System

1.2.2.1 Einleitung

Protein C ist ein wesentlicher Bestandteil des antikoagulatorischen Systems. Es gewährleistet über die Inhibition der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (Marlar et al., 1982, Fay et al., 1991, Kalafatis et al., 1994) die Blutzirkulation vor allem in den Kapillaren. Das 62 000 Dalton große Molekül Protein C, das das Schlüsselenzym des Protein C-Systems darstellt (Nicolaes und Dahlbäck, 2002; Esmon, 2003; Dahlbäck 2005), wird Vitamin K abhängig gebildet und besteht aus einer leichten (144 AS) und einer schweren Kette (262 AS).

Diese Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Funktionell wird Protein C in folgende Domänen eingeteilt: Es besteht aus einer Gla-reichen Domäne, 2 EGF-like Domänen, einer Serinproteaseregion und einem 12 AS langen *Aktivierungspeptid* (short activating peptide) (siehe Abb. 4). Die Gla-reiche Domäne entsteht Vitamin K-abhängig durch posttranslationale Carboxylierung von Glutamatresten (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Die Konzentration des Protein C beträgt im Plasma ca. 3 µg/ml und liegt damit gegenüber der aktivierten Form, dem aktivierten Protein C (APC), in 1000 bis 10 000fachem Überschuss vor (Griffin et al., 2007). Es hat im Vergleich zu anderen Proteasen eine relativ lange Halbwertszeit von ca. 20 Minuten. Im aktivierten Zustand besitzt das Protein C nicht nur eine antikoagulatorische sondern auch eine antiapoptotische (Riewald und Ruf, 2003; Esmon, 2004) und eine antiinflammatorische (Bernhard et al., 2001; Griffin et al. 2007; Esmon, 2003) Wirkung. Wegen seiner Wirkweise wird es seit Oktober 2002 in der Behandlung der schweren Sepsis mit Multiorganversagen als Medikament (XIGRIS®) eingesetzt (Grinnell und Joyce, 2001).

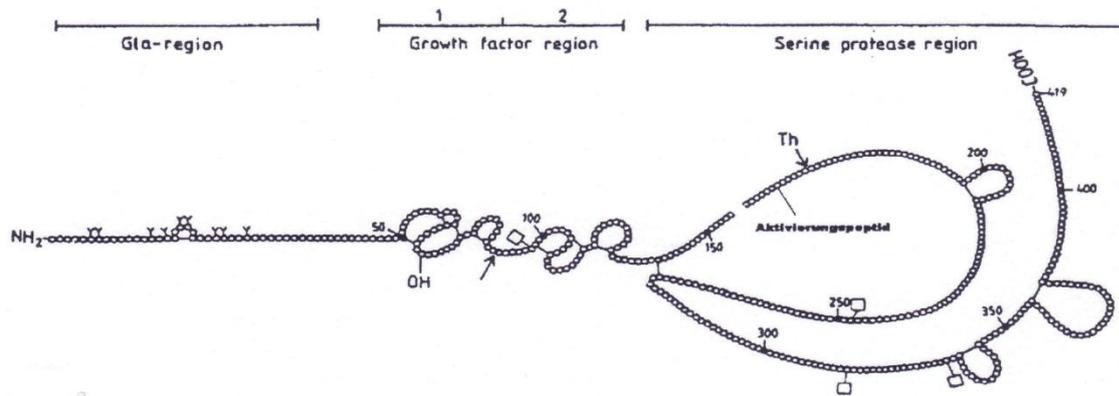


Abb. 4: Schematische Darstellung des Protein C (Haerberli, 1992). Der Pfeil kennzeichnet die Bindungsstelle zwischen der EGF-like Domäne 1 und EGF-like Domäne 2. Die Aminosäuren wurden durchnummeriert, NH_2 -bezeichnet die Aminogruppe, $-\text{COOH}$ die Carboxylgruppe. Wichtige Aminosäuren wurden gekennzeichnet. Th = Threonin, OH- = OH-Gruppe eines Serin, - = Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein, γ - Carboxylgruppen der Glutaminsäure (Gla-region), □ = Katalytische Domäne

1.2.2.2 Aktivierung des Protein C

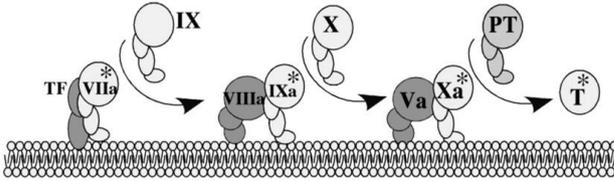
Die Aktivierung des Protein C erfolgt über den Thrombin/Thrombomodulin-Komplex. Hierzu muss Thrombin an Thrombomodulin binden (Ye et al., 1991; Esmon, 2003) (siehe Abb. 5). Thrombomodulin kommt auf allen Endothelzellen vor, in besonderer Dichte aber auf den Kapillarendothelien, da hier eine große Endothelfläche einem kleinen Volumen an Blut gegenübersteht. Das 75 kD schwere Thrombomodulin ist ein membranassoziertes Protein und fungiert als Cofaktor des Thrombins bei der Aktivierung des Protein C. Es besteht aus einer Lectin-, einer hydrophoben-, 6-EGFs (EGF5 und EGF6 sind die Bindungsdomänen für das Thrombin), einer Ser/Thr-reichen- und einer transmembranen Domäne mit einem zyttoplasmatischen Schwanz. Auch Thrombin alleine kann Protein C aktivieren, doch durch die Beteiligung des Thrombomodulin wird eine 1000fach verstärkte Aktivierungsrate erzielt (Dahlbäck und Villoutreix, 2005).

Anzumerken ist, dass durch die Bindung des Thrombins an das Thrombomodulin die prokoagulatorische Wirkung des Thrombins, die Aktivierung von Faktor V, VIII und XIII sowie die Plättchenaktivierung, verloren geht.

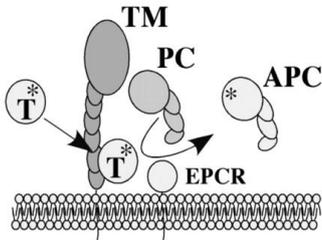
Wie in *Abbildung 5* gezeigt, wird Protein C über die Gla-Domäne an den Rezeptor EPCR (*endothelial protein C receptor*) gebunden, der ebenfalls auf der Oberfläche der Endothelien

lokalisiert ist. Dies führt zu einer weiteren 20fachen Stimulation der T-TM-assoziierten Aktivierung (Esmon, 2000; Esmon, 2003).

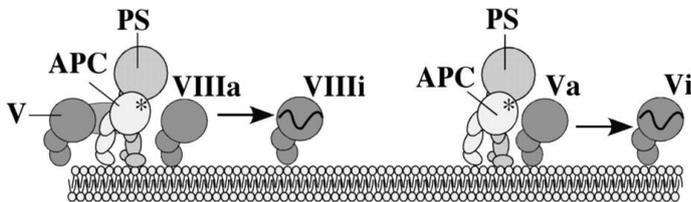
I Activation and propagation of coagulation



II Activation of protein C by T-TM-EPCR



III Degradation of FVIIIa and FVa by APC



IV Domain structures of protein C pathway components

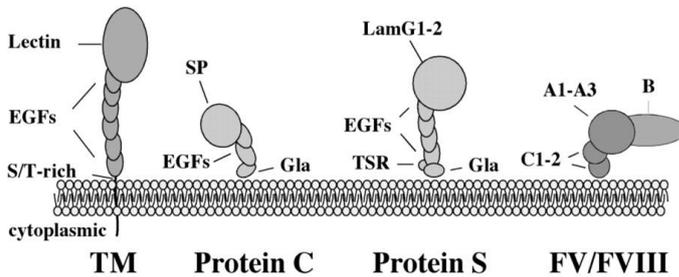


Abb. 5: Das antikoagulierende Protein C-System.

I Aktivierung der Blutgerinnung durch den Faktor VIIa gebunden an TF.

II Aktivierung des Protein C durch den TM-T-EPCR-Komplex.

III Faktor VIIIa- und Faktor Va-Inaktivierung durch APC.

IV Aufbau der im Protein C-System beteiligten Faktoren mit ihren Untereinheiten (Dahlbäck und Villoutreix, 2005).

Durch den Komplex aus Thrombin-TM-EPCR wird Protein C zu aktiviertem Protein C (APC) proteolytisch gespalten. Ca^{2+} -Ionen sind bei dieser Reaktion notwendig, denn sie vermitteln die

Bindung zwischen dem Protein C und den negativ geladenen Phospholipiden auf der Oberfläche der Endothelzellen (Sadler, 1997). Die Ca^{2+} -Ionen führen nach Bindung der Gla-Region des Protein C zu einer Konformationsänderung, so dass die Phospholipide gebunden werden können. Auch während des Proteolysevorgangs sind Ca^{2+} -Ionen notwendig. Sie binden an eine bestimmte Stelle in der NH_2 -terminalen EGF-Domäne des Protein C-Moleküls und führen so zu einer Strukturveränderung der schweren Kette. Auf diese Weise kommt es zu einer korrekten Präsentation des Aktivierungspeptids (Dahlbäck und Villoutreix, 2005).

1.2.2.3 Wirkung

Die antikoagulatorische Wirkung des durch den T-TM-EPCR-Komplex aktivierten APCs wird durch die proteolytische Inaktivierung der Kofaktoren Va und VIIIa erreicht.

Für die Hemmung benötigt das APC zwei Cofaktoren, das Protein S und den Faktor V zur Ausführung seiner Funktionen. Während der Faktor Va alleine durch die Anwesenheit des Protein S inaktiviert werden kann, ist für die Inaktivierung des Faktors VIIIa sowohl Protein S, als auch Faktor V notwendig (Dahlbäck und Villoutreix, 2005) (siehe Abb. 5).

Das Vitamin K-abhängig synthetisierte Protein S verstärkt die Wirkung des APCs um ca. das 10fache und beschleunigt die Inaktivierung des Faktors Va (Dahlbäck und Villoutreix, 2003; Espana et al., 2005). Der Faktor Va wird an 3 Peptidbindungen gespalten; zuerst wird das Protein an Arg506, danach an den Positionen Arg306 und Arg679 unterbrochen (Mann und Kalafatis, 2003; Butenas et al., 2006). Die Spaltung an Arg506 hat nur einen partiellen Aktivitätsverlust zur Folge. Erst eine nachfolgende Spaltung an Position Arg306, assoziiert mit der kompletten Dissoziation der A2-Domäne, führt zu einer kompletten Inaktivierung des Faktors Va (Mann et al., 1997). Im Gegensatz dazu verläuft die Spaltung an Arg679 vergleichsweise langsam und weist eine untergeordnete physiologische Bedeutung auf (Asselta 2006).

Die Inhibition des Faktors VIII ist komplexer und benötigt zusätzlich zu Protein C Faktor V als Cofaktor (Varadi et al., 1996). Gespalten wird das Protein an den Aminosäuren Arg336 und Arg562 unter Mitwirkung von Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden. Damit Faktor V als Cofaktor wirksam werden kann, muss der Faktor V an der Aminosäure Arg506 durch APC gespalten werden. Durch Thrombin wird der Faktor V an der B-A3-Bindung unterbrochen und verliert so seine Wirkung als Cofaktor.

Ein Mangel an Protein S führt zu einer verminderten Aktivität des APC und kann erhebliche Folgen haben (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Patienten mit einem Protein S Mangel fallen bereits in jungen Jahren durch rezidivierende Thrombembolien und tiefe Venenthrombosen auf. Durch eine hohe Affinität des Protein S gegenüber negativ geladenen Phospholipiden, verhilft es dem APC zur Bindung an Phospholipidoberflächen. Auch ein schützender Effekt von Faktor Xa auf Faktor Va, hinsichtlich der Inaktivierung durch APC, in Anwesenheit des Protein S, wird verringert (Rezende et al., 2004). Protein S besteht aus einem Einzelstrang mit einer Gla-Region, einer Thrombin-sensitiven-Region (TSR), 4 EGF-like-Regionen und 2 Laminin-G-typ-Domänen (LamG). Eine Interaktion mit dem APC findet dabei über nahezu alle Domänen statt (Dahlbäck und Villoutreix, 2005).

Nur das im Körper frei vorliegende Protein S (ca. 30- 40%) ist funktionell aktiv (Rezende et al., 2004). Die fehlenden 60-70% binden einen Regulator des klassischen Komplementsystems, das C4B-Protein (Blom et al., 2004).

Dem APC werden nicht nur antikoagulatorische, sondern auch antientzündliche und antiapoptotische Wirkungen zugesprochen. Diese Wirkungen werden vor allem über die Rezeptoren EPCR und einen weiteren Rezeptor PAR-1 (*protease activated receptor 1*) vermittelt. In Studien konnte gezeigt werden, dass APC die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten, die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten an die Endotheloberfläche und die Transmigration inhibiert (Grinell et al., 1994).

Eine hemmende Wirkung auf das Protein C-System haben unter physiologischen Bedingungen folgende Moleküle, welche als Serin-Protease-Inhibitoren bezeichnet werden: Protein C-Inhibitor (PCI) (Hermanns und Stone, 1993, Suzuki et al., 1994, Geiger, 2007), der in seiner Aktivität durch Heparin gesteigert werden kann (Aznar et al., 1996, Friedrich et al., 2001), α_1 -Antitrypsin (Shen et al., 2002), α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin (Heeb et al., 1991).

1.2.2.4 Störungen des Protein C-Systems

Gerinnungsstörungen, die das Protein C-System betreffen, werden in diesem Kapitel besprochen. Auf weitere relevante Störungen des Gerinnungssystems wird im Kapitel 1.2.3 eingegangen.

Die Wichtigkeit des Protein C-Systems wird deutlich, wenn bei einem Patienten ein qualitativer oder funktioneller Mangel an Protein C vorliegt. Die Prävalenz für einen hereditären homozygoten Defekt, bei der die Protein-C-Aktivität auf unter 5% reduziert ist, liegt bei 1:500

000-750 000 (Pötzsch, 2007). Der Defekt äußert sich gerade bei Neugeborenen in einer schweren Form der Purpura fulminans, die mit einer ausgeprägten Thrombosierung und Mikrozirkulation einhergeht (Pötzsch, 2007). Der heterozygote Defekt kommt mit einer Prävalenz von 1:300 vor. Mit diesem Defekt ist ein siebenfach erhöhtes Risiko für das Ereignis einer Venenthrombose gegenüber gesunden Individuen assoziiert (Mann und Kalafatis, 2003).

Der am häufigsten vorkommende Gendefekt innerhalb des Protein C-Systems wird als *Faktor-V-Leiden-Mutation* oder als APC-Resistenz bezeichnet. Diese Mutation wirkt sich prothrombotisch aus (Vos, 2006) und kann bei 20-40% der Venenthrombosen in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Ursache dieses Defektes ist in ca. 80% der Fälle ein Aminosäure-Austausch im Faktor V-Protein an Position 506, an der statt einem Arginin nun ein Glutamin gebunden wird (R506Q) (Rosendaal, 1999). Die Spaltung des Arg506 ist entscheidend für die Freilegung der beiden anderen Bindungsstellen Arg306 und 679. Der Faktor V besitzt weiterhin volle koagulatorische Funktion, doch die antikoagulatorischen Eigenschaften gehen verloren. In der Folge kann APC den Faktor V an der Peptidbindung am Arg506 nicht mehr spalten.

Man geht davon aus, dass die Faktor-V-Leiden-Mutation auf einem „Foundereffekt“ (Zivelin et al., 1997) basiert und in der Evolution als Schutz vor Blutverlusten ein Selektionsvorteil gewesen sein muss. Die Mutation ist vor allem bei der weißen Bevölkerung verbreitet, Afrikaner und Asiaten sind dagegen fast nie betroffen. Weiterhin lässt sich in Europa ein Nord-Süd-Gefälle nachweisen, die Prävalenz beträgt 10-20% im Norden- und 2% im Süden Europas. Das Venenthromboserisiko ist bei heterozygoten Trägern um 5% und bei homozygoten Trägern um 50% erhöht (Mann und Kalafatis, 2003).

1.2.2.5 Therapeutische Verwendung von APC

Das Molekulargewicht des durch eine humane Nierenzelllinie hergestellten APCs beträgt 46 kD und ist damit bis auf wenige Zuckerreste mit dem physiologischen APC identisch. Die antikoagulatorische, antientzündliche und antiapoptotische Wirkung des APCs wurde bereits in Kapitel 1.2.2.3. beschrieben. In einer Phase 3 Studie mit 1600 Patienten im Doppelblindversuch (PROWESS) konnte gezeigt werden, dass die Sterblichkeit der Patienten mit schwerer Sepsis, die mit Placebo behandelt wurden bei 30,8% lag, gegenüber einer Sterblichkeit von 24,7% bei der APC behandelten Gruppe (Macias et al., 2002; Bernhard et al., 2003). Diese Studie bezog sich auf die Applikation von APC in einem Zeitraum von 28 Tagen. Im Ergebnis ist eine absolute

Risikoreduktion aller Todesursachen um 6,1% zu verzeichnen. Die relative Risikoreduktion beträgt 19,4%. Vor allem bei Patienten mit refraktärem septischen Schock und Patienten mit respiratorischer Insuffizienz liefert APC eine deutliche Verbesserung der Sterblichkeitsrate (Bernhard et al., 2003). XIGRIS® ist nur indiziert im Falle einer schweren Sepsis mit Multiorganversagen als zusätzliche Maßnahme zur Standardtherapie. Kontraindiziert ist XIGRIS® bei inneren Blutungen, bei vermehrter Blutungstendenz, bei gleichzeitiger Heparin-gabe und bei Thrombozythopenien (Bernhard et al., 2003).

1.2.2.6 Potentielle therapeutische Anwendung von APC-Inhibitoren

Seit 1998 wird von Butenas und Mann. eine medikamentöse APC-Inhibition zur unterstützenden Behandlung der Hämophilie propagiert. Klinische Studien und Experimente mit transgenen Mäusen haben angedeutet, dass Hämophilie A- und B-Patienten von einer vollständigen APC-Inhibition, z.B. in Form einer vorliegenden Faktor-V-Leiden-Mutation profitieren könnten (Butenas et al., 2006). Eine Behandlung mit APC-Inhibitoren und damit eine Kompensation des niedrigen Faktor VIII-Spiegels bei Hämophilie A-Patienten ist denkbar, da eine Wirksamkeit in in vitro Studien mit *benzamidine-* oder *peptidomimetic-*basierenden-Derivaten nachgewiesen werden konnte (Butenas et al., 2006; De Nanteuil et al., 2006). In diesen Studien lassen sich Blutungskomplikationen seltener feststellen und die Blutungsneigung ist vermindert. Die Faktor-V-Leiden Mutation äußert sich in einer effektiven Inhibierung des APCs, da das APC an Position 506 des Faktors V durch die Mutation nicht mehr binden kann (Butenas et al., 2006). Das APC wird effektiv inaktiviert, während der Faktor V ungestört enzymatisch aktiv sein kann. Da das APC auch hemmenden Einfluss auf den Faktor VIIIa hat, der ohnehin schon erniedrigt vorliegt, kann durch eine APC-Inhibition auch die Halbwertszeit des prokoagulatorischen Faktors VIIIa gesteigert werden. Im Ergebnis ist es möglich, dass bei einem Patienten mit Hämophilie A oder B die Blutungsneigung zu einem Teil kompensiert werden könnte.

Die auf *benzamidine-* und *peptidomimetic-*basierenden-APC-Inhibitoren hatten den Nachteil, dass sie nicht vollständig selektiv im Hinblick auf Thrombin waren (Butenas et al., 2006; De Nanteuil et al., 2006). Zusätzlich ist nicht sicher ob und wie toxisch die Substanzen auf den menschlichen Körper reagieren. Dieser Aspekt und die schlecht ausgeprägte Selektivität der beiden Derivate leiten zu der Suche nach einem nicht toxischen und hoch spezifischen APC-Inhibitor.

Die Behandlung mit rekombinantem APC (XIGRIS®) ist wirksam bei Patienten mit schwerer Sepsis und reduziert die Mortalität (Bernhard et al., 2003). Der Einsatz des Medikaments ist allerdings eingeschränkt, da bei ca. 2% der Patienten schwere Blutungen als Nebenwirkung auftreten (Levi, 2008). Durch ein Antidot, was spezifisch an APC bindet und dessen Wirkung schnell aufhebt, könnte die klinische Verwendung von XIGRIS® sicherer werden, vor allem im Hinblick auf die APC-induzierte Blutung.

1.2.3 Störungen des Gerinnungssystems

Die prokoagulatorischen und die antikoagulatorischen Komponenten des Gerinnungssystems stehen bei einem gesunden Menschen im Gleichgewicht. Überwiegt der Einfluss der prokoagulatorisch wirkenden Faktoren kommt es vermehrt zu einer Thromboseneigung. Liegt ein Übergewicht des antikoagulatorischen Systems vor, so resultiert eine verstärkte Blutungsneigung. Die Ursachen für eine solche Störung sind sehr vielfältig und können sowohl angeboren sein, als auch im Verlauf von erworbenen Krankheiten auftreten. In diesem Kapitel werden eine Auswahl von Störungen beschrieben, die für diese Arbeit eine besondere Relevanz haben.

1.2.3.1 Hereditäre Störungen des Gerinnungssystems

a. Thrombozytopathien

Die Funktion der Thrombozyten kann durch verschiedene Gründe gestört sein. Membranproteine und Speicherorganellen können in ihrer Funktion defekt sein und so zu einer Verlängerung der primären Hämostase führen. Obwohl Thrombozytopathien sehr selten zu Spontanblutungen führen, kommen Blutstillungskomplikationen nach Verletzungen oder Operationen vor. Zu den angeborenen selten vorkommenden Thrombozytopathien gehören das Bernard-Soulier-Syndrom, die Thrombasthenie Glanzmann und die Storage-Pool-Erkrankung (Herold, 2007).

b. Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWS)

Bei dem Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom handelt es sich um die häufigste angeborene Blutungsneigung mit einer Prävalenz von 1%, wobei nur eine kleine Anzahl der Betroffenen signifikante Symptome haben. Der Erbgang ist vorwiegend autosomal dominant und selten rezessiv, so dass Frauen wie Männer gleichermaßen erkranken (Ruggeri, 2003). Zu Grunde

liegen qualitative und /oder quantitative Defekte des von-Willebrand-Faktors (vWF) (Dahlbäck, 2005).

Die Erkrankung wird in 3 Typen unterteilt: Typ 1 ist charakterisiert durch einen Mangel sowohl an Faktor VIII als auch an vWF. Bei Typ 2, der wiederum in 4 Untergruppen unterteilt ist, ist die Qualität des vWF mangelhaft, während die Plasmakonzentration meist normal bleibt. Bei Typ 3 fehlt der vWF komplett und daraus resultieren schwerwiegende Folgen: Sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase sind bei diesem Syndrom defekt (Herold, 2007).

Gestört wird die primäre Hämostase durch eine mangelhafte Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel (Dahlbäck, 2005). Die Fibrinbildung wird unterdrückt durch die fehlende Bindung des Faktors VIII. Auch dieser Defekt führt zu einer verlängerten Blutungszeit, der sich, bei leichten Formen häufig nicht bemerkbar macht. In schweren Fällen kann es jedoch zu schweren Blutungen, z.B. im Bereich der Schleimhäute, führen (z.B. rezidivierendes Nasenbluten, ausgiebiges Bluten nach einer Zahnextraktion) (Herold, 2007).

Eine Dauertherapie ist in den meisten Fällen nicht notwendig. Zur medikamentösen Therapie wird eine Gabe von Aspirin® und Thrombozytenaggregationshemmern vermieden. Bei leichten Blutungen des Typ 1 kann Desmopressin gegeben werden (s.o.). Bei schwereren Blutungen des Typs 3 ist Desmopressin kontraindiziert und es sollte mit vWF-Konzentraten behandelt werden, um die Gerinnung zu verbessern (Mannucci, 2004).

c. Hämophilie A

Die Hämophilie A ist eine x-chromosomal rezessiv vererbte Gerinnungsstörung, die durch einen Mangel an Faktor VIII bedingt ist, in ca. 50% der Fälle angeboren ist und mit einer Prävalenz von etwa 1:10 000 auftritt. Da das Gen des Faktors VIII auf dem x-Chromosom lokalisiert ist, sind Männer durch diesen Erbgang häufiger betroffen, während Frauen dagegen häufig lediglich gesunde Überträgerinnen sind. Durch den Mangel (Typ 1) oder die Funktionslosigkeit (Typ 2) (Herold, 2007) des Faktors VIII kommt es zu einer Verminderung des intrinsischen Gerinnungsweges und zum Verlust der Verstärkerschleife (Amplifier Loop) über das extrinsische System. Auf diese Weise kommt es zu einer verminderten Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin.

Die Hämophilie wird in 3 Schweregrade eingeteilt. Unter 1%-Restaktivität des Faktors VIII wird sie als schwer, zwischen 1-5%-Restaktivität als moderat und zwischen 6-25%-Restaktivität als mild eingestuft (Klinge et al., 2002). Während bei den leichten und milden Formen

Blutungskomplikationen gewöhnlich lediglich nach einem Trauma auftreten, können bei schwerer Ausprägung spontan schwere Blutungen, v.a. im Bereich der Gelenke (insbesondere der Kniegelenk) und der Muskeln resultieren, die unter Umständen auch lebensbedrohlich sein können (Pötzsch und Madlener, 2002). Typisch bei der Hämophilie A ist, dass die primäre Hämostase normal abläuft, während die sekundäre Hämostase deutlich verlängert ist. Dies äußert sich in Nachblutungen.

Noch in den 1930er Jahren starben die meisten Patienten in der frühen Kindheit, während heute ein Patient mit Hämophilie eine fast normale Lebenserwartung besitzt (Klinge et al., 2002). Zur Behandlung vermeidet man eine Gabe von Medikamenten, die die Thrombozytenaggregation hemmen (z.B. Aspirin®). Bei der leichten Form der Hämophilie A und erhöhter Blutungsgefahr kann ein Medikament, Desmopressin, gegeben werden, das Faktor VIII und den vWF aus dem Endothel freisetzt. Desmopressin kann jedoch nur für ein paar Tage gegeben werden, weil es zur Erschöpfung der gespeicherten Faktoren kommt (Herold, 2007). Die steigende Lebenserwartung ist vor allem auf die Entwicklung von hochgereinigten/virusinaktivierten sowie rekombinant hergestellten Faktor VIII-Präparaten zurückzuführen (Klinge et al., 2002). Während es ausreicht, bei leichten Formen der Hämophilie bei Bedarf zu substituieren sollte das Faktor VIII-Präparat bei schweren Formen regelmäßig gegeben werden.

Die Therapie mit Faktor VIII-Präparaten geht mit zwei Hauptproblemen einher. Einerseits besteht eine Infektionsgefahr der Patienten, andererseits kann es zu einer Induktion von Antikörpern kommen (Bishop und Lawson, 2004). In den 1980er Jahren wurde durch die regelmäßige Gabe von Faktor VIII-Präparaten und Bluttransfusionen eine HIV-Erkrankung bei bis zu 50% der Hämophilie-Patienten entdeckt (Ragni et al., 1987). Die Sicherheit der Produkte konnte in den danach folgenden Jahren durch Virus-inaktivierende Schritte in der Produktion stark verbessert werden. Das Risiko für eine Übertragung mit z.B. Hepatitis A- oder B-Virus, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus oder HIV soll bei hochgereinigten/virusinaktivierten Präparaten nicht bestehen und ist bei rekombinanten Präparaten ausgeschlossen (Herold, 2007). Die Faktor VIII-Ersatztherapie führt in bis zu 25% der Hämophilie-Patienten zu einer Induktion von Faktor VIII hemmenden Antikörpern (Lusher et al., 1993). Diese induzierten Faktor VIII-Antikörper führen zu einer schnellen Inaktivierung des Faktor VIII-Konzentrats, die dann erneut mit einer Blutungstendenz einhergeht, die dann nicht mehr mit Faktor VIII-Konzentraten behandelbar ist.

d. Hämophilie B

Auch dieser Gerinnungsdefekt wird x-chromosomal rezessiv vererbt, ist aber 10fach seltener als die Hämophilie A. Hierbei liegt ein Mangel an Faktor IX, der auch Christmas-Faktor genannt wird vor (Herold, 2007). Auch die Hämophilie B wird in eine schwere (unter 1%-Restaktivität), milde (1-5%-Restaktivität) und leichte Form (bis 30%-Restaktivität) eingeteilt (Dahlbäck, 2005). Wie auch bei der Hämophilie A äußern sich lediglich die schweren Formen der Hämophilie B in spontanen Blutungsepisoden (Dahlbäck, 2005).

Zur Therapie werden Faktor IX-Konzentrate verwendet. Dazu können sowohl aufgereinigte (z.B. Berinin®: humaner reiner Faktor IX) sowie rekombinante Faktor IX-Konzentrate verwendet werden (BeneFIX®) (White et al., 1997). Je nach Schweregrad der Erkrankung werden diese bei Bedarf oder regelmäßig alle 2-3 Tage gegeben. Auch bei der Applikation der Faktor IX-Präparate kann es zur Hemmkörperausbildung kommen, doch ist diese Nebenwirkung sehr viel seltener als bei der Behandlung der Hämophilie A mit Faktor VIII-Konzentraten (Shapiro et al., 1998).

e. Faktor II-Mutation

Die Mutation an Position 20210 des 3'-untranslatierten Teil des Gens steht in Verbindung mit einer erhöhten Prothrombin-Aktivität im Plasma. Bei der seltenen homozygoten Form kommt es zu schweren Thrombembolien. Die heterozygote Form besitzt in der Bevölkerung eine Prävalenz von 1-2% und erhöht das Thromboserisiko um das zwei- bis dreifache im Vergleich zu den nicht-Mutationsträgern (Witt und Dörner, 2003).

1.2.3.2 Erworben Störung des Gerinnungssystems-Sepsis

Seit 1992 werden SIRS (*Systemic inflammatory response syndrome*), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock getrennt definiert (Meier-Hellmann, 2006).

Ein SIRS liegt vor wenn 2 der 4 folgenden Kriterien erfüllt sind: Fieber oder Hypothermie ($>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$), Tachykardie ($>90/\text{min}$), Tachypnoe (>20 Atemzüge/min oder Hyperventilation) und Leukozytose oder Leukopenie ($>12\ 000/\mu\text{l}$ oder $<4\ 000/\mu\text{l}$).

Eine Sepsis ist definiert als SIRS, die durch eine festgestellte Infektion verursacht wird. Bei Organbeteiligung spricht man von einer schweren Sepsis und bei Versagen des Kreislaufs von einem septischen Schock. Trotz vieler Weiterentwicklungen im intensivmedizinischen Bereich, liegt die Letalität der schweren Sepsis immer noch bei 30-50% (Bernhard et al., 2001).

In einem Zustand der Sepsis gelingt es dem Wirt nicht, die Entzündungsantwort gegen einen infektiösen Herd lokal zu begrenzen. Normalerweise ist das Immunsystem des Körpers in der Lage durch Abwehrmechanismen Erreger abzuwehren. Ist aber die Immunabwehr geschwächt, die Infektion massiv oder wird sie mit vielen aggressiven Erregern unterstützt, so reicht die Immunantwort nicht mehr aus (Meier-Hellmann, 2006). Das Resultat ist eine generalisierte Entzündungsreaktion mit Aktivierung des zellulären (Monozyten-Makrophagen, Lymphozyten, usw.) und des humoralen Abwehrsystems (Komplementsystem, Gerinnungssystem, Kininsystem) (Meier-Hellmann, 2006). Aus dem infektiösen Herd können immer weiter Erreger nachgeliefert werden. Es besteht eine akute Gefahr der Durchblutungsstörung und des Sauerstoffmangels. Gerade die Gerinnungsstörung ist eine wichtige Ursache der Kreislaufdestabilisation. Sind Organe betroffen kommt es zum Multiorganversagen, das einen baldigen Tod zur Folge hat (Bernhard et al., 2001).

Die Entzündungsreaktion und die Gerinnung sind eng miteinander verbunden. Inflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 sind in der Lage die Gerinnung zu fördern und die Fibrinolyse zu hemmen. Thrombin kann hingegen inflammatorische Kaskaden stimulieren (Bernhard et al., 2001). Patienten mit schwerer Sepsis können eine Symptomatik ausbilden, die der Purpura fulminans neonatorum und dem Protein C-Mangel vergleichbar ist (Pötzsch, 2007).

Für die kausale Therapie, das heißt die Ursache beseitigende Therapie, der Sepsis ist es zunächst wichtig, dass der infektiöse Fokus gefunden und wenn möglich chirurgisch entfernt wird (Herold, 2007). Zusätzlich können zur kausalen Therapie Antibiotika gegeben werden.

Zur supportiven Therapie ist die Sicherstellung eines adäquaten Volumenstatus enorm wichtig, um eine ausreichende Perfusion zu gewährleisten. Reicht die Volumensubstitution alleine nicht aus, sollte zusätzlich ein Vasopressor gegeben werden (z.B. Noradrenalin, Vasopressin) (Meier-Hellmann, 2004). Auch die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff ist sicherzustellen, notfalls muss der Patient beatmet werden. Es besteht auch die Möglichkeit den Patienten Erythrozytenkonzentrate zukommen zu lassen. Wichtig ist, dass ein adäquater Perfusionsdruck aufrecht erhalten bleibt, um den Kreislauf zu stabilisieren. Die Steuerung des Blutzuckerspiegels ist gestört, deshalb muss dieser konsequent durch Insulin-Gabe normalisiert werden (Meier-Hellmann, 2006).

Aktiviertes Protein C (APC) kommt als adjuvante Therapie in der schweren Sepsis zum Einsatz. Als adjuvante Therapie bezeichnet man alle therapeutischen Ansätze, die darauf abzielen, das der Sepsis zu Grunde liegende Geschehen selektiv zu beeinflussen (Meier-Hellmann, 2006). Mit

APC behandelte Patienten haben im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe eine 6,1% niedrigere Letalität (Bernhard et al., 2001). Aufgrund der potenziell erhöhten Blutungsneigung als Nebenwirkung sollte das APC nur unter strenger Beachtung der Kontraindikationen verabreicht werden (siehe Kapitel 1.2.2.5) (Meier-Hellmann, 2006).

1.2.4 Aptamere

1.2.4.1 Einleitung

Das Wort aptus kommt aus dem lateinischen und heißt „passen“, der griechische Begriff meros bedeutet Teilchen. Das „passende Teilchen“ besteht aus kurzen einzelsträngigen DNA- oder RNA-Oligonukleotiden mit 25-70 Basen, die spezifisch und hochaffin Moleküle über ihre 3D Struktur binden können (Mayer und Famulok, 2007). Die Eigenschaften der Aptamere sind dabei ähnlich den Eigenschaften monoklonaler Antikörper. Aptamere haben jedoch einige Vorteile und werden deshalb in Zukunft eine mögliche Alternative zur Behandlung mit Antikörpern darstellen (Jayasena, 1999). Im Vergleich zu Antikörpern binden Aptamere über ihre 3D Struktur an größere Epitopstrukturen. Wichtige Interaktionen werden dabei durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen und Basen-Stapelung erzielt. Über die Ausbildung von Helices, Tripel-Helices, Haarnadelschleifen, Pseudoknoten und G-Quartette wird eine hohe Variabilität erreicht. Weitere Vorteile der Aptamere liegen in der chemischen Stabilität und ihrer niedrigen Immunogenizität (White et al., 2000, Wlotzka et al., 2002). Die Affinität gegenüber dem Bindungspartner ist hoch und liegt im nanomolaren und subnanomolaren Bereich (Proske et al., 2005). Die Bindungspartner können sehr unterschiedlich sein. Beschrieben sind bindende Aptamere für kleine organische Moleküle (Mannironi et al., 1997; Famulok, 1999), Aminosäuren (Burgstaller et al., 1995; Geiger et al., 1996), Peptide (Nieuwland et al., 1995), Proteine (Lupold et al., 2002; Iwazaki et al., 2005) und sogar lebende Zellen und Viren (Yan et al., 2005; Gopinath et al., 2006). Die hohe Spezifität zeigt sich darin, dass sie auch in ihrer Bindung zwischen sehr ähnlich aufgebauten Proteinen unterscheiden können. Darüber hinaus können auch Isoenzyme unterschieden werden (Conrad und Ellington, 1996).

Aptamere werden durch ein Verfahren identifiziert, das als *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)* bezeichnet wird. Dieses Verfahren wurde erstmals 1990 unabhängig von 2 Arbeitsgruppen beschrieben (Ellington und Szostak, 1990; Tuerk und Gold,

1990). Über die SELEX-Methode können Aptamere in vitro hergestellt werden, ohne dass Versuchstiere verwendet oder aufwendige Zellkulturen angelegt werden müssen (Ng et al., 2006). Aptamere können sowohl in der Diagnostik (Brody et al., 1999), in Reinigungsprozessen (Romig et al., 1999), in der Separation (Burgstaller et al. 2002), in der Funktionsanalytik (Mayer und Famulok, 2007) als auch therapeutisch eingesetzt werden (Nimjee et al., 2005). Seit 2004 steht mit *Pegaptanib* das erste Aptamer als Medikament zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration bereit (Ng et al., 2006). *Pegaptanib* nimmt damit eine Vorreiterstellung für weitere sich in präklinischen und klinischen Studien befindende Aptamere im Bereich der Krebsforschung, Stoffwechselstörungen, kardiale Störungen und der Blutgerinnung ein (Mayer und Famulok, 2007). Ein großer Vorteil der Nukleinsäurenatur der Aptamere ist, dass sie durch Antisense-Moleküle neutralisiert werden können, so dass die Wirkung schnell und effizient aufgehoben werden kann (Rusconi et al., 2004; Heckel et al., 2006). Insbesondere nach Operationen kann durch ein entsprechendes Antidot die antikoagulatorische Wirkung schnell neutralisiert werden (Mayer und Famulok, 2007). Dies macht die Gruppe der Aptamere zu einem gut dosierbaren Werkzeug.

1.2.4.2 Herstellungsverfahren SELEX und Modifizierung

Das SELEX-Verfahren zur Selektion von Aptameren besteht aus 3 wesentlichen Schritten. Der Selektion, der Separation und der Amplifikation (Ng et al., 2006). Der Begriff Evolution bezieht sich dabei auf eine fortlaufende Entstehung und eine Zunahme von Oligonukleotiden an bereits selektierte Muster, die mit einer absteigenden Komplexität einhergeht.

Grundvoraussetzung ist eine einzelsträngige Oligonukleotid-Bibliothek, die Oligonukleotide in zufällig unterschiedlicher Basenfolge besitzt wird von 2 konstanten Bereichen am 3'-Ende und am 5'-Ende eingeschlossen, die als Primerbindungsregion für die Amplifikation selektierter Sequenzen fungieren (Beaudry und Joyce, 1992). In der hoch variablen Startbibliothek sind bei einem randomisierten Bereich von beispielsweise 120 Nukleotiden $4^{120} = 10^{72}$ verschiedene Startsequenzen enthalten.

Die DNA- bzw. RNA-Oligonukleotid-Bibliothek wird mit dem Zielmolekül, gegen welches Aptamere selektiert werden sollen, inkubiert. Die meisten Oligonukleotide besitzen keine Affinität, nur eine geringe Anzahl konkurriert um die Bindung an das Molekül. Diejenigen Oligonukleotide mit der höchsten Affinität gegenüber dem präsentierten Molekül können binden.

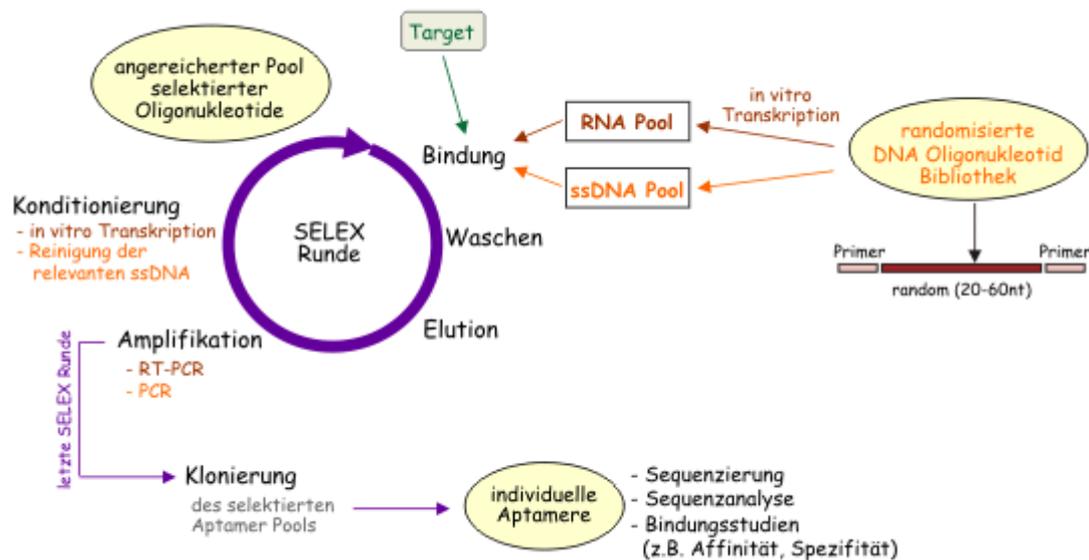


Abb. 6: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des SELEX-Prozesses (Stoltenburg, 2007). Um Aptamere zu generieren wird die randomisierte Oligonukleotidbibliothek, in der die einzelnen Oligonukleotide mit konstanten Bereichen flankiert werden, mit dem Target-Molekül inkubiert. Hierzu können ssDNA und RNA Pools verwendet werden. Nur die Oligonukleotide mit der höchsten Affinität können an das Target-Molekül binden. Durch den Waschschrift werden die die affinen - von den weniger affinen Oligonukleotide seperiert. Die affinen Oligonukleotide müssen von dem Target-Molekül wieder getrennt werde (Elution). Die getrennten Oligonukleotide werden durch eine PCR amplifiziert und nach Aufreinigung erneut mit dem Target-Molekül zusammengebracht. Der Zyklus beginnt erneut. Nach Abschluss einiger Selex-Runden ergibt sich ein Pool aus spezifisch und hochaffin bindender Aptamere.

Im Schritt der Separation werden die gebundenen von den ungebundenen Nukleinsäuren getrennt. Dies wird durch die Immobilisierung der Zielmoleküle erreicht, was ein Entfernen der nicht gebundenen Sequenzen durch einen Waschschrift erlaubt (siehe Abb. 6).

Im Amplifikationsschritt werden die gebundenen Oligonukleotide von dem Zielmolekül getrennt und über eine PCR vervielfältigt (siehe Abb. 6). Hierfür sind die konstanten Bereiche maßgeblich, die als Ansatzort für die Primer dienen. Die gebildeten Nukleotide werden mittels einer PCR amplifiziert bzw. bei Vorlage einer RNA, zuerst durch eine reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA überführt. Nach der Amplifikation erfolgt eine Einzelstrangtrennung (DNA), bzw. eine Transkription von RNA-Molekülen über eine in die Primerbindungsdomäne eingebrachte Promotorsequenz. Es entsteht ein Pool aus DNA- bzw. RNA-Fragmenten, der im

Vergleich zu dem vorausgegangenen Zyklus eine gesteigerte Bindungseigenschaft zu dem Zielmolekül besitzt.

Dieser Zyklus wird in der Regel zwischen 6- und 20mal wiederholt (Mayer und Famulok, 2007). Nach Abschluss dieses Prozesses kristallisieren sich im Erfolgsfall einige spezifisch und hochaffin bindende Aptamere heraus, welche in der Regel Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren bis hohem picomolaren Bereich aufweisen.

Nach der Selektion werden die identifizierten Sequenzen bezüglich ihrer Sekundärstruktur analysiert. In der Regel erfolgt anschließend die Ermittlung des minimalen Bindungsmotivs, was zu der Entfernung der zur Bindung an das Zielmolekül nicht notwendigen Sequenzabschnitte führt.

Aptamere sind als kurze DNA- oder RNA-Oligonukleotide anfällig gegenüber im Blut befindlichen Nukleasen. Nukleasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören die Exonukleasen, die eine hydrolytische Spaltung eines Oligonukleotids vom 3'- und vom 5'-Ende her zur Folge haben. Die zweite Gruppe, bestehend aus den Endonukleasen, nimmt eine hydrolytische Spaltung innerhalb der Nukleinsäurekette an bestimmten Schnittstellen vor. Im humanen Blut besitzt eine 3'-Exonuklease die größte Wirkung (Dougan et al., 2000). RNA-Oligonukleotide besitzen gegenüber Nukleasen eine geringere Haltbarkeit und sind deshalb in diesem Punkt gegenüber den DNA-Aptameren benachteiligt.

Um gerade RNA-Aptamere vor Nukleasen zu schützen und die Stabilität zu verbessern, können sie am 2'-OH-Ende durch 2'-Aminogruppen, 2'-Fluorogruppen (Gold et al., 1995) oder 2'-O-Methyl-Gruppen (Burmeister et al., 2005) modifiziert werden. Darüber hinaus können die Aptamere verstärkt werden, indem eine Kappe an das 3'-Ende geheftet wird (Proske et al., 2005). In Versuchen mit dem schon untersuchten Aptamer Pegaptanib konnte gezeigt werden, dass die Exkretion und Metabolisierung der Aptamere über den Urinaltrakt statt findet (Ng et al., 2006). Aufgrund ihrer geringen Größe werden sie über die Niere schnell eliminiert. Die Bioverfügbarkeit kann erhöht werden, indem hochmolekulare Moleküle angehängt werden. Die Halbwertszeit von Aptameren im Blut ist sehr kurz (Mayer und Famulok, 2007). Diese Wirkungszeit ist für die therapeutische Anwendung für ein therapeutisch verwendetes Aptamer unvorteilhaft. Durch ein Anhängen von PEG (Polyethylenglykol) (ca.40 kD) am 3'- oder 5'-Ende

des Aptamers steigt die Halbwertszeit im Falle des Pegaptanib zur Behandlung der altersbedingte Makuladegeneration auf 10+/- 4Tage (Mayer und Famulok, 2007).

1.2.4.3 Aptamere in der Therapie und Diagnostik

Aptamere können vielseitig eingesetzt werden. Die Indikationsgebiete sind die Krebsforschung, Stoffwechselstörungen, z.B. die Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen und die altersbedingte Makuladegeneration (Mayer und Famulok, 2007).

Obwohl bisher noch keine Medikamente im Bereich der Krebsforschung (Onkologie) auf dem Markt existieren, ist die Hoffnung groß, in diesem Bereich medikamentös eingreifen zu können (Groner, 2004; Chu et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Shangguan et al., 2006). So laufen zurzeit einige Studien zum Einsatz von Aptameren, v.a. in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML). Auch die Diagnostik und Therapie viraler Erkrankungen mit Aptameren werden beschrieben (Kohn et al., 1999; James, 2007). Ein wichtiger Anwendungsbereich ist außerdem die Regulation der Blutgerinnung (Bock et al., 1992; Rusconi et al., 2002; Mayer et al., 2007). Bekannt sind Aptamere gegen Thrombin und gegen Faktor IX, deren Einsatzbereich sich auf die Antikoagulation während koronarer Bypass-Operationen erstreckt (Mayer und Famulok, 2007). Auch gegen den vWF wurde der Einsatz von Aptameren beschrieben, welche bei einem Akuten Koronarsyndrom Verwendung finden sollen. Auch die Fusionierung zweier Aptamere gegen Thrombin dürfte ein neuer vielversprechender Ansatz sein (Müller et al., 2007; Müller et al., 2008).

Das erste auf Aptameren basierende zugelassene Medikament ist ein kurzsträngiges RNA-Molekül, *Pegaptanib* (Macugen®), entwickelt im Jahr 1998 von Ruckmann et al., das in der Augenheilkunde zur Behandlung der feuchten altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt wird (Starita et al., 2007). Im Dezember 2004 wurde Pegaptanib in den USA als Medikament zugelassen und ist seit Mai 2006 auch in Deutschland erhältlich. Es hemmt hochspezifisch und sehr affin den im Auge vorkommenden Wachstumsfaktor VEGF-Isotop-165 (*Vascular endothelial growth factor*) und blockiert auf diese Weise die Neovaskularisation im Bereich der Netzhaut (Ng et al, 2006).

Aber auch im Bereich der Grundlagenforschung kann die Technik der Aptamere zur Charakterisierung von Biomolekülen verwendet werden (Mayer und Famulok, 2007). Auf dem Gebiet der chemischen Biologie und chemischen Genetik können Aptamere z.B. als Werkzeug

im *Hochdurchsatz-Screening* verwendet werden. U.a. können kleine organische Substanzen sehr spezifisch erkannt werden (Mayer und Famulok, 2007). Auf dieser Eigenschaft basiert auch der Ende 2006 entwickelte Schnelltest gegen Kokain (Liu und Lu, 2006).

1.2.4.4 Aptamere gegen APC

Über den in Kapitel 1.2.4.2 erklärten SELEX-Prozess wurden an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in einem Gemeinschaftsprojekt des *Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin* und des *Kekulé Instituts für Organische Chemie und Biochemie* DNA-Aptamere gegen APC generiert. Als APC-Vorlage im SELEX-Prozess griff man auf das Medikament *XIGRIS*® zurück (Salehi, 2007). Als Aptamer-Startbibliothek wurde die sogenannte D1-Bibliothek mit einer 49-Basen-langen, von zwei Primerbindungsstellen flankierten, variablen Sequenzregion eingesetzt (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-N49-CATGCTTATTCTTGTCTCCC-3'). Zur Charakterisierung der selektierten Aptamere wurde der nach dem zehnten Selektionszyklus erhaltene Pool kloniert und die Inserts der Vektoren einzelner colony-forming-units sequenziert. Durch diese Vorgehensweise konnte eine Vielzahl von Aptamer-Sequenzen identifiziert werden, welche allerdings eine gemeinsame Konsensussequenz aufwiesen. Zur Überprüfung der APC-Bindungseigenschaften der verschiedenen Monoklone wurden 4 der identifizierten Sequenzen (HS02, HS03, HS04 und HS08) synthetisiert und in Filterbindungsexperimente eingesetzt.

Im Vergleich zu den anderen oben genannten Aptameren wies das Aptamer HS02 die niedrigste Dissoziationskonstante (K_D) und somit die höchste Affinität gegenüber APC auf. Aus diesem Grund wurde das Aptamer HS02 herangezogen um ein Minimalmotiv zu erstellen. Von der Originalsequenz des Aptamers, welches 88 Basen (HS02-88) lang war, verkürzte man das Aptamer am 5'- und am 3'-Ende. Wie bereits erwähnt ist allen Aptameren dieses Monoklons eine Konsensussequenz mit gezeigter Stem-Loop-Struktur gemeinsam (siehe Abb. 7).

Eine Verkürzung des Aptamers ist möglich bis zu einer Länge von 44 Basen, danach führt eine weitere Verkürzung zur Wirkungsabnahme des Aptamers (Salehi, 2007). In den „G“-Motiven (HS02-52G, 48G, 44G) wurden am 3'-Ende jeweils eine T-Base ausgetauscht um den gezeigten einen CT-Mismatch zu entfernen.

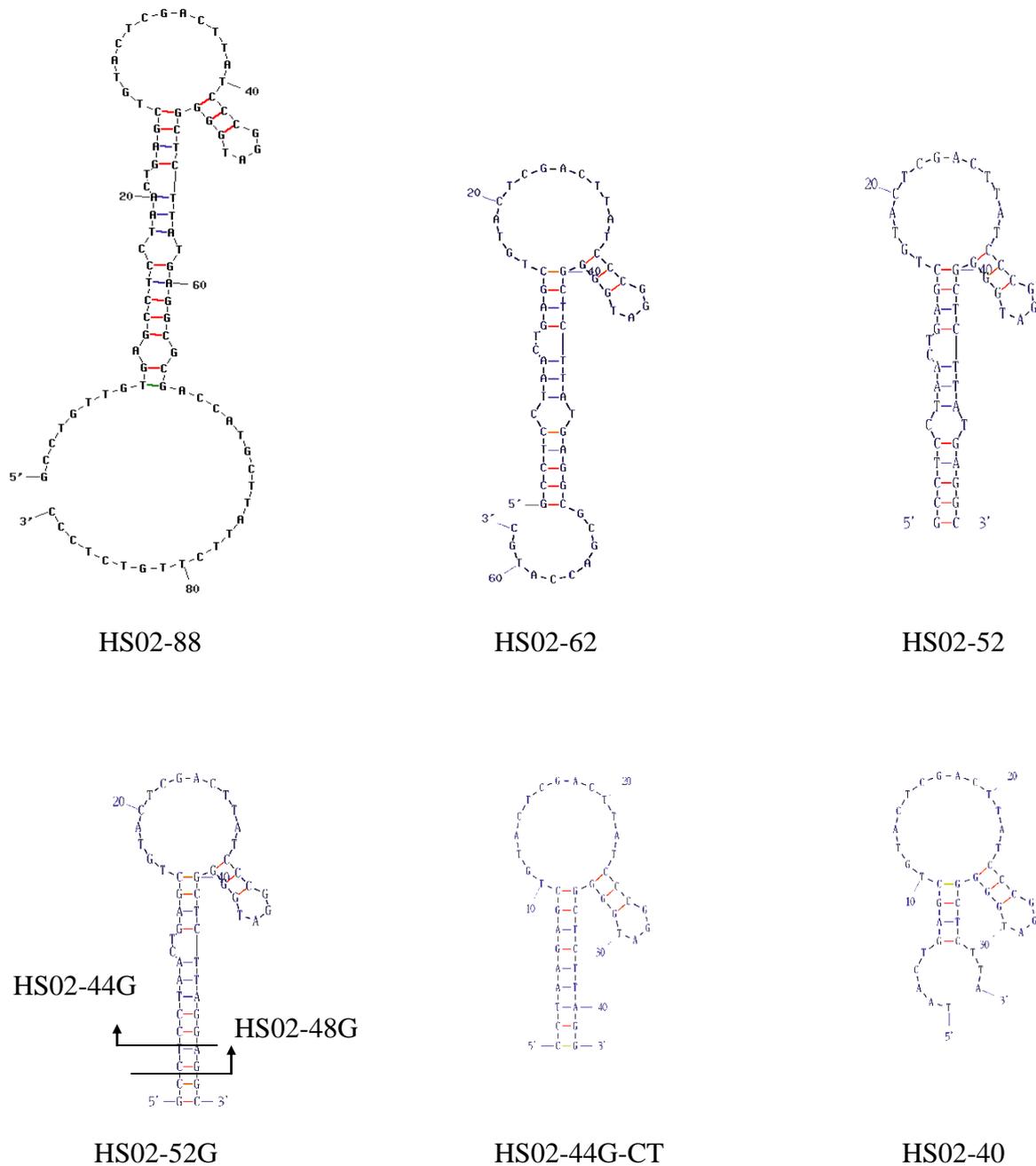


Abb. 7: Berechnete Sekundärstrukturen der Aptamergruppe HS02, von dem aus 88 Basen bestehendem Aptamer HS02-88 ausgehend bis zum Minimalmotiv HS02-44G. In der Variante HS02-44G-CT wurden im Basisstamm 2 Basen gekürzt, so dass sich ein CT-Überhang nicht ausbilden kann. Es ist bei den Aptameren HS02-44G-CT und HS02-40 im Vergleich zu den anderen Aptamervarianten eine deutliche Abnahme der Wirksamkeit zu erkennen (Salehi, 2007). Zur Berechnung der Sekundärstrukturen der Aptamer-Varianten wurde das mfold Programm zur DNA-Faltung verwendet, das unter www.bioinfo.rpi.edu/applications verfügbar ist (Zuker, 2003).

Informationen über die Sekundärstruktur und Stabilität der Aptamere geben die von Müller et al. (2009) beschriebenen ΔG -Werte (siehe Tabelle 1). Je niedriger der ΔG -Wert (kcal/mol) liegt, desto stabiler ist das Aptamer.

Tabelle 1

Aptamer	ΔG -Werte (kcal/mol)
HS02-44G	-3,45
HS02-48G	-6,03
HS02-52G	-10,11
HS02-62	-5,65
HS02-88	-6,5

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

1.3.1 Zielsetzung

In dieser Dissertation sollen die in *Abbildung 7* gezeigten Aptamersequenzen bezüglich ihres APC-inhibierenden Potentials und ihrer Stabilität in der Plasmamatrix charakterisiert werden.

Dabei soll die Wirkung der Aptamere auf den durch APC verlängerten Gerinnungsablauf gezeigt, die inhibitorische Aktivität (IC_{50} -Werte) der Aptamere gegenüber APC bestimmt und die Stabilität der Aptamere in Ca^{2+} -freien- und Ca^{2+} -haltigem Plasma getestet werden.

Als Resultat soll die Variante der beschriebenen Aptamere identifiziert werden, die die beste inhibitorische Aktivität bei gleichzeitig möglichst hoher Stabilität in der Plasma- und Vollblutmatrix aufweist. Das Aptamer mit den geeignetsten Eigenschaften kann dann in weitergehenden Versuchen, wie z.B. in vivo Applikationen im Tiermodell verwendet werden.

1.3.2 Fragestellung

Die Fragestellung betrifft vornehmlich den therapeutischen Nutzen eines Aptamers, welches spezifisch APC bindet und dessen antikoagulatorische Funktion zu inhibieren vermag.

Es ist in klinischen Studien und in Experimenten mit transgenen Mäusen zu beobachten, dass Patienten und Tiere, die gleichzeitig zu einer Hämophilie A oder B eine Faktor-V-Leiden-Mutation aufweisen, mit einem niedrigeren Nachblutungsrisiko behaftet sind. Deshalb liegt eine Annahme nah, dass durch den Einsatz eines effektiven APC-Inhibitors, der in der Konsequenz auch die Inhibition der Faktoren VIIIa und Va unterdrückt, zu einer Verminderung des Nachblutungsrisikos bei der Hämophilie A und B führen kann (Butenas et al., 2006; De Nanteuil, 2006). Außerdem wird beschrieben, dass über eine Hemmung des Protein C-Systems die Halbwertszeit des Faktors VIII verlängert werden kann und somit bei Hämophiliekranken, bei denen von vorne herein schon eine erniedrigte Faktor VIII-Aktivität vorliegt, eine Blutungsneigung vermindert werden kann, wenn auch nur durch einen kleinen Anstieg der Faktor VIIIa-Aktivität, der indes aber entscheidende Wirkung zeigt (Butenas et al., 2006; De Nanteuil, 2006). In dieser Arbeit sollen die Vorteile eines Aptamers als potentiell therapeutisch einsetzbarer APC-Inhibitor im Vergleich zu den bisher beschriebenen APC-Inhibitoren herausgearbeitet werden.

Eine weitere Fragestellung ist, ob das APC-Aptamer geeignet ist als Antidot, für das im Falle einer schweren Sepsis verwendete rekombinant hergestellte APC (XIGRIS®) eingesetzt zu werden. Eine durch eine Überdosierung hervorgerufene Blutungsneigung könnte dadurch neutralisiert werden.

2 Materialien

2.1 Verwendete Chemikalien

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazin-äthansulfonsäure (Hepes)

Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Ampuwa® (Wasser für Injektionszwecke)

KMF Laborchemie, Lohmar

1 M Natronlauge (NaOH)

1 M Salzsäure (HCl)

Merck GmbH, Darmstadt

Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

Magnesiumchlorid (MgCl_2)

Natriumchlorid (NaCl)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Bovine Serum Albumin (BSA)

Ethanol abs. (EtOH)

2.2 Verwendete Reagenzien

American Diagnostics, Stanford, USA

Rekombinantes humanes Thrombomodulin (rTM)

Rabbit lung Thrombomodulin

Bayer AG, Leverkusen

Hirudin (Refludan®)

Eli Lilly Export S.A., Genf, Schweiz

APC (Drotrecogen Alpha, XIGRIS®)

Dade Behring, Marburg

Aktin FS®

Aktin FSL®

Faktor VIII-Mangelplasma

Innovin® (Tissue Factor Reagenz zur Quick-Wert Bestimmung)

In-house Produktion

Citrat-Poolplasma von gesunden Blutspendern

Microsynth, Balgach, Schweiz

88-Aptamer: ssDNA Oligonukleotide, Page gereinigt

62-Aptamer: ssDNA Oligonukleotide, Page gereinigt

52G-Aptamer: ssDNA Oligonukleotide, Page gereinigt

48G-Aptamer: ssDNA Oligonukleotide, HPLC gereinigt

44G-Aptamer: ssDNA Oligonukleotide, HPLC gereinigt

Roche GmbH, Mannheim

Liquemin® 5000 Einheiten/ml

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Polybren (Hexadimethrin-Bromid)

Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande

Calibrator-Reagenz (α_2 M-Thrombin)

PPP-Reagenz (Tissue Factor Reagenz zur Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials)

2.3 Verwendete Materialien

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Venofix (0,8 mm, 21 G, grün)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Einweg-Pasteurpipetten (3 ml)

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendorfcups (1,5 und 2 ml)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Citratröhrchen (4,5 ml) (1 Teil Citratlösung (0,1 mol/l = 38 g/l) und 9 Teile Blut gemischt)

Multi Adapter

S-Monovette Serum (9 ml)

Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden

Mikrotiterplatten (*96 well plate*)

2.4 Verwendete Geräte

Cenco instrumenten, Breda, Niederlande

Vortexer

Eppendorf GmbH, Hamburg

Centrifuge 5804

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Wasserbad

Trinity Biotech GmbH, Lemgo

Kugelkoagulometer AMAX 190 plus

Gilson, Ohio, USA

Kolbenhubpipetten (P10, P20, P200, P1000, P5000)

Methrom Deutsche GmbH & CO, Filderstadt

pH-Meter 744

Mettler, Gießen

Digitalwaage (Modell PL 1200)

Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

Platten-Fluoro/Luminometer Fluoroscan Ascent

3 Methodik

3.1 Allgemeine Versuchsprinzipien

3.1.1 Einleitung

Basismethode in allen Versuchen war die Messung der Gerinnungszeit oder die Bestimmung der Thrombingenerierung über die plasmatische Gerinnungskaskade durch Aktivierung des extrinsischen- oder des intrinsischen Gerinnungswegs.

Dabei wurde die Gerinnungsreaktion über den extrinsischen Weg durch die Zugabe von Gewebsthromboplastin (Tissue Factor, TF), Phospholipiden und Ca^{2+} zu der Plasmaprobe gestartet. Der intrinsische Aktivierungsweg wurde generell über die Zugabe von partiellem Thromboplastin und Ca^{2+} zu der Plasmaprobe aktiviert. Bei partiellem Thromboplastin handelt es sich um eine Mischung aus einem Oberflächenaktivator und einem gereinigten Sojabohnenphospholipid. Wie bei der Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges, ist der Ablauf der intrinsischen Gerinnungskaskade abhängig von der Anwesenheit von freien Ca^{2+} -Ionen in den Versuchsansätzen. Nach der Aktivierung der Gerinnungsreaktion erfolgte zum einen die Messung der Zeitdauer bis zur Ausbildung eines detektierbaren Fibringerinnsels (Gerinnungszeit) zum anderen ein Monitoren der Thrombinbildungs-Kinetik. Die Gerinnungszeiten wurden hierbei mit einem automatischen Kugelkoagulometer (AMAX 190 plus) bestimmt. Die Erfassung der Thrombingenerierung erfolgte mittels eines Plattenfluorometers (Fluoroscant Ascent).

Durch die Zugabe von APC zu den Reaktionsansätzen konnte unter entsprechend optimierten Testbedingungen, die gemessene Gerinnungszeit verlängert bzw. die detektierbare Generierung von Thrombin verhindert werden. Dieser Umstand stellte die Basis aller durchgeführten Versuche dar, welche stets die Aptamer vermittelte Inhibition des in den Proben befindlichen APCs zur Grundlage hatten.

Nachfolgend sollen die Prinzipien der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche auf den beiden verwendeten Geräteplattformen beschrieben werden.

3.1.2 Messung der Gerinnungszeiten

Die Gerinnungszeiten wurden mit dem Gerinnungsautomaten AMAX bestimmt. Dabei handelt es sich um ein Gerät, das auch in der Routinemessung eingesetzt wird. Der AMAX 190 kann über einen Einkanal-Pipettierarm definierte Reagenzien nach zuvor programmiertem Ablauf pipettieren. Dabei können die Menge an Reagenz, die Pipettier-Reihenfolge und eine eventuelle Vorinkubation bis zu 600 Sekunden bei 37 °C der gemischten Proben eingestellt werden. Die Gerinnungsreaktion wird endlich über ein zuletzt zugefügtes Reagenz, wie z.B. Ca²⁺-Ionen, Tissue Factor oder partielles Thromboplastin gestartet. Nach Zugabe des Startreagenz beginnt die Messung der Gerinnungszeit, wobei die verwendete Messküvette in Rotation versetzt wird. Am Boden der Messküvetten befindet sich eine Eisenkugel, die durch einen Magneten in Position gehalten wird. Gerinnt die Probe, kommt es also zur Ausbildung eines Fibringerinnsels, so wird die Kugel durch die Rotation und die steigende Viskosität aus ihrer Position in eine Rotationsbewegung ausgelenkt. Dieser Zeitpunkt wird als Endpunkt der Gerinnungsmessung erfasst und auf einen Computer übertragen.

3.1.3 Bestimmung der Thrombingenerierung

Die Thrombingenerierung dient zur Bestimmung des endogenen Thrombinbildungspotenzials (ETP) in einer Citratplasmaprobe. Sie basiert auf der Messung des Fluoroscan Gerätes und nutzt zur Auswertung, je nach Einstellung, die Fluoroscan Ascent-Software oder die Thrombinoscope-Software. In der Routine kann dieses Gerät zur Bewertung des Blutungs- oder Thromboserisikos, zur Überwachung einer Antikoagulantientherapie oder einer Substitutionstherapie mit Faktorenkonzentraten verwendet werden (Hemker et al., 2003).

Um enzymatisch aktives Thrombin nachzuweisen wurde ein fluorogenes Peptidsubstrat verwendet (siehe Abb. 8). Es handelt sich bei dem verwendeten Substrat um 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), das nach Spaltung der anhänglichen Peptidstruktur durch Thrombin fluorometrisch nachgewiesen werden kann (Kawabata et al., 1988). Die Messung der Fluoreszenz geschieht jeweils automatisch nach einer Periode von 20 Sekunden.

In den einzelnen Proben werden die Kinetiken des Substratumsatzes mit Hilfe eines Plattenfluorometers gemessen und können dann an einem Computer über die *Thrombinoscope Software* bzw. *Fluoroscan Ascent-Software* ausgewertet werden. Dieses Messprinzip ermöglicht es die absolute Thrombinentstehung in nM pro Zeiteinheit zu bestimmen.

Bei einer Messung über die Thrombinoscope Software, werden zusätzlich Calibratoransätze hinzupipettiert, die das Peptidsubstrat im Vergleich zu den Testansätzen kontinuierlich umsetzen. Sie haben die Aufgabe, die gemessenen Werte in Bezug auf den „inner-filter“ Effekt, den Fluoreszenzcharakter der unterschiedlichen Plasmaproben und den Substratverbrauch zu normalisieren. Dadurch ist eine Vergleichbarkeit verschiedener Messungen untereinander gegeben.

Z-Gly-Gly-Arg-AMC * HCL

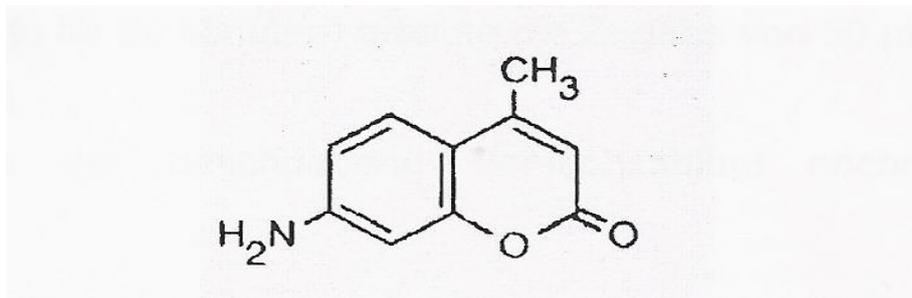


Abb. 8: Chemische Formel des verwendeten fluorogenen Peptidsubstrats und seine Struktur.

3.2 Spezifische Versuchsprinzipien

3.2.1 IC₅₀-Bestimmungen der Aptamere

3.2.1.1 Einleitung

Der IC₅₀-Wert entspricht der Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird. Durch die Bestimmung dieses Wertes ist eine Vergleichbarkeit der inhibitorischen Wirkung der Aptamere untereinander gegeben. Über Verdünnungsreihen der Aptamere wurden IC₅₀-Werte sowohl über die Gerinnungszeitmessung (AMAX 190 plus Kugelkoagulometer) als auch über das fluorogene Testsystem (Fluoroscan Ascent) bestimmt. Zur Auswertung der Messreihen wurde eine Software verwendet, die über die Gerinnungszeiten eine Kurve interpolierte und so einen IC₅₀-Wert ermittelte. Versuche der IC₅₀-Wert Bestimmung konnten entweder über den intrinsischen oder über den extrinsischen Gerinnungsweg gemessen werden.

3.2.1.2 Gerinnungszeitmessung

Eine Gerinnungszeitmessung über den AMAX 190 plus Kugelkoagulometer wurde mit Verdünnungsreihen aller Aptamere der Gruppe HS02 durchgeführt. Gemessen wurde in Ca^{2+} -freiem Plasma (Citratplasma), in Ca^{2+} -haltigem Plasma (Heparin-, Hirudinplasma) und in Hirudinvollblut. Ziel war es, in jedem der Medien eine Messung mit Aptamerverdünnungsreihen über den extrinsischen- und über den intrinsischen Gerinnungsweg durchzuführen. In den Messungen wurden größtenteils lineare in Aqua destilliert gelöste Verdünnungsreihen verwendet, seltener auch halblogarithmische.

Für die Versuche mit Citratplasma standen ausreichend gepoolte Proben von in-house produzierten Spenderplasmen zur Verfügung. Die Versuche mit Heparinplasma, Hirudinplasma und Hirudinvollblut wurden mit frisch abgenommenem und entsprechend antikoaguliertem Vollblut durchgeführt. Zur Gewinnung der Proben wurden Leerröhrchen vorbereitet. Für die Versuche in Heparinplasma wurde ein Leerröhrchen (S-Monovette Serum 9 ml) jeweils mit Heparin (Liquemin®) 1 Unit/ml Vollblut gefüllt. Die Hirudinproben besaßen unterschiedliche Konzentrationen je nach Versuchsaufbau und Ablauf. Nun konnte gesunden Spendern Blut entnommen werden. In einer Tischzentrifuge bei 4000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 15 Minuten wurde das Plasma vom Zellbestand getrennt. Das Heparinplasma und Hirudinplasma wurden sorgfältig abpipettiert. Danach wurde das Plasma gepoolt, um eine Ungleichheit der Plasmazusammensetzung einzelner Individuen auszugleichen. Eine Vergleichbarkeit zwischen der Liquemin®-Konzentration und Hirudinkonzentration, die bei selbstabgenommenen Proben differieren kann, wird in den Versuchen dadurch erreicht, dass alle Aptamere mit demselben gepoolten Plasma gemessen wurden.

Für eine genaue Aktivitätsmessung der Aptamere (IC_{50} -Bestimmung) über die Gerinnungszeit ist eine sehr kurze Gerinnungsreaktionsdauer wie die Thrombinzeit (*Quick*) ungünstig, denn sie führt zu einem schmalen Messspektrum mit hoher Fehlerbreite. Deshalb musste das Innovin®-Reagenz (Tissue Factor-Reagenz zur Quick-Wert Bestimmung) mit einer Tris/HCL-Pufferlösung vorverdünnt werden um die Gerinnungsreaktion zu verzögern. Für sämtliche hier beschriebenen Versuche wurde ein Tris/HCL-Puffer in einer Konzentration von 10 mM Tris/HCL und 150 mM NaCl bei einem pH von 7,6 in destilliertem Wasser gelöst verwendet. Dem Puffer wurden 0,1% BSA hinzugegeben. Den Proben wurde APC hinzugegeben um die Gerinnungszeit zu verlängern. Dabei war eine Messbreite zwischen 30 Sekunden ohne APC-Zugabe und 60 Sekunden unter Einfluss von APC anzustreben. In diesem Zeitrahmen, der für jeden einzelnen Versuch neu

justiert wurde, war eine gute Auflösung der Wirkung der verschiedenen Aptamerkonzentrationen gegenüber APC möglich. Die Konzentration des APCs wurde innerhalb des Versuchsablaufs immer konstant bei behalten.

Im Gegensatz zur Thrombinzeit eignet sich die im Normalfall 35-40 Sekunden dauernde partielle Thromboplastinzeit (*APTT*) für die IC_{50} -Bestimmung der Aptamere. Als Startreagenz für den intrinsischen Gerinnungsablauf wurde das aus partiellem Thromboplastin bestehende Aktin FS®, bzw. Aktin FSL® verwendet. Die Ergebnisse basieren demnach auf Gerinnungszeiten, von denen auf die Aktivität der Aptamere zurückgeschlossen werden kann.

3.2.1.3 Fluorogenes Testsystem

Die Versuche über das fluorogene Testsystem basierten auf der Aktivierung der Gerinnungskaskade und deren Inangangsetzung über den extrinsischen oder intrinsischen Aktivierungsweg (Innovin®, Aktin FSL®). Die Werte der Fluoreszenzmessung werden auf ein Computerprogramm übertragen, das die Werte in eine Kurve übersetzen kann.

Es können deutlich mehr Messungen parallel durchgeführt werden als bei der Messung über die Gerinnungszeit (siehe Kapitel 3.2.1.2). Möglich ist es, in einer Messreihe auf einer Mikrotiterplatte alle Aptamerverdünnungsreihen in einem Versuch gleichzeitig zu messen.

Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde mit Probe (Poolplasma + Hirudin) bestückt. Über die nun folgende Zugabe eines Gemischs aus Puffer (Fluo-Buffer), $CaCl_2$ und einem thrombinspezifischen fluorogenen Substrat wurde die Gerinnungsreaktion über die extrinsische (Innovin®) oder über die intrinsische Gerinnungsaktivierung (Aktin FSL®) ausgelöst. Die verwendete Pufferlösung (Fluo-Buffer), die in allen über den Fluoroscan Ascent gemessenen Versuchen verwendet wurde, bestand aus 20 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7,35. Zusätzlich wurden 60 mg/ml BSA (bovine serum Albumin) hinzugegeben. Über die Fluoreszenz eines durch Thrombin aktivierten, fluoreszierenden Substrates wird die Entstehung von Thrombin quantifiziert.

In diesem Versuchsteil konnte mit Poolplasma experimentiert werden, da durch die zusätzliche Zugabe von Hirudin und die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen, die Ca^{2+} -Komplexierung durch Citrat zwar weiter bestehen blieb, aber aufgrund einer Überladung von Ca^{2+} -Ionen nicht mehr wirksam war.

Zwar wird Hirudin nicht notwendigerweise für die Gerinnungsreaktion benötigt, jedoch vergrößert sich die Messspanne durch die Verwendung von Hirudin und die Gerinnungsreaktion

wird verzögert. Für den Versuchsteil mussten in Vorversuchen die optimale Hirudinkonzentration und die optimale APC-Konzentration ermittelt werden. Zu beachten war, dass je höher die APC-Konzentration gewählt wurde, desto weniger gerann die Probe. Als Konsequenz kann das Gerät einen geringeren Fluoreszenzanstieg feststellen. Wird die APC-Konzentration im Gegenzug zu niedrig gewählt, so ist auch die antikoagulatorische Aktivität niedrig und es besteht die Schwierigkeit in einer geringen Messbreite den hemmenden Einfluss der Aptamere exakt zu quantifizieren.

3.2.1.4 Datenanalyse

Zur Auswertung wurden zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Werte) die Gerinnungszeiten aus den Versuchen mit dem AMAX 190 plus Koagulometer in jeweils einen Graphen aufgetragen. Zur Auswertung des fluorogenen Testsystems wurde die Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Messwert (*Maximum-Minimum*) herangezogen. Ein weiterer wichtiger Parameter stellt die *Time-to-maximum-rate* dar. Sie entspricht dem Zeitpunkt, an dem am meisten Substrat durch Thrombin umgesetzt wird. Die Gerinnungszeiten wurden gegen die jeweilige Aptamerkonzentration in einem Graphen aufgetragen.

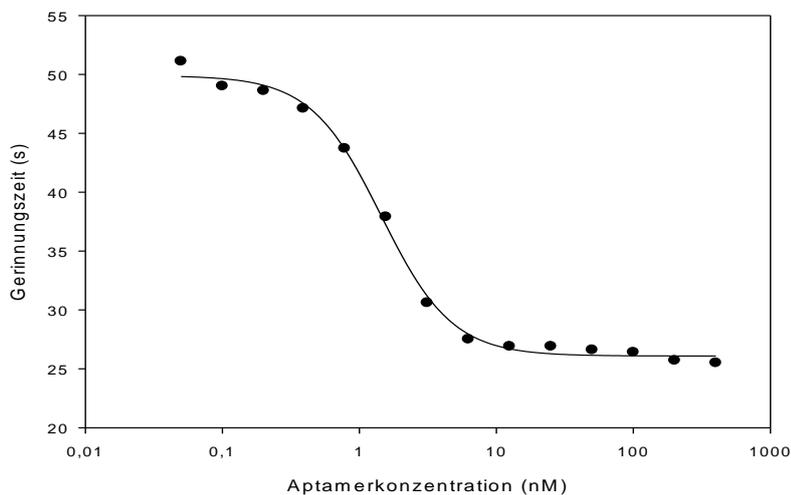


Abb. 9: Darstellung der Beziehung zwischen der Konzentration des Aptamers und der zugehörigen Gerinnungszeit über den extrinsischen Gerinnungsweg am Beispiel des Aptamers HS02-44G in Hirudinplasma.

Mit Hilfe der Software SigmaPlot® 9.0 konnte über die ermittelten Daten eine Ausgleichskurve gelegt und die im Ergebnisteil über die Software Microsoft Excel® 2003 präsentierten IC₅₀-Werte ermittelt werden (siehe Abb. 9).

3.2.2 Stabilitätsbestimmung der Aptamere

3.2.2.1 Einleitung

In diesem Versuchsteil sollte ermittelt werden, wie anfällig die DNA-Aptamere gegenüber DNAsen im Plasma sind. Eine automatische Inkubation mit dem AMAX 190 plus Kugelkoagulometer ist bis 600 Sekunden möglich. Messreihen mit längeren Inkubationszeiten konnten einerseits über einen anderen Ablauf mit Hilfe der Messung der *Gerinnungszeit*, andererseits mit Hilfe des *fluorogenen Testsystems* durchgeführt werden.

3.2.2.2 Gerinnungszeitmessung

Das Prinzip bestand darin, Aptamere in Plasmaproben vorzulegen und bei 37°C für einen definierten Zeitraum inkubieren zu lassen. Das APC-Reagenz (XIGRIS®) wurde in jeder Messung frisch hinzugegeben, kurz bevor durch ein Aktivierungsreagenz die Gerinnung gestartet wurde. Jegliche Verlängerung der Gerinnungszeit im Ablauf des Versuchs war also auf den Verlust der Aktivität der Aptamere zurückzuführen. Auch diese Messungen wurden für alle Aptamere (HS02-88, 62, 52G, 48G und 44G) im Vergleich durchgeführt.

Da sich die Reagenzien im AMAX 190 plus Kugelkoagulometer nur bis maximal 600 Sekunden automatisch vorinkubieren lassen, wurde in den ersten Versuchen eine erste Messreihe bis 600 Sekunden durchgeführt. Die Reagenzien Plasma und Aptamere konnten auf diese Weise getrennt als 2 Reagenzien in das Gerät positioniert und vorinkubiert. Die einzelnen Konzentrationen der Aptamerproben waren während des Versuchs konstant. Sie wurden so niedrig gewählt, dass sich eine denkbare Beeinträchtigung der Aptamere durch DNAsen möglichst schnell in einer Verlängerung der Gerinnungszeit geäußert hätte.

Um den Einfluss von längeren Inkubationszeiten (bis 180 Minuten) auf die Aktivität der Aptamere im Plasma festzustellen, musste in einer zweiten Messreihe ein anderer Versuchsablauf gewählt werden. Alle Plasmaproben wurden schon im Vorhinein mit Aptameren bestückt. Das Plasma-Aptamer-Gemisch wurde nach definierten Zeiten in den AMAX 190 plus

Kugelkoagulometer gestellt und die Gerinnungszeit wurde bestimmt. In den Zwischenzeiten wurden die Proben in einem Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Das APC-Reagenz wurde auch hier zu jedem Zeitpunkt frisch hinzupipettiert.

3.2.2.3 Fluorogenes Testsystem

Wenn Plasmen zu lange Zeit im Wasserbad oder bei Raumtemperatur stehen bleiben, werden Gerinnungsfaktoren zunehmend inaktiv (Witt und Dörner, 2003). Um diesen Effekt gerade bei langen Inkubationszeiten zu minimieren, sollte vor jeder Messung frisches Plasma hinzugegeben werden. Dieses Konzept, welches in vorausgehenden Versuchen ausgetestet wurde, war auf folgende Weise realisierbar: Es wurde Hirudinplasma mit einer finalen Hirudinkonzentration von 10 µg/ml hergestellt. Diesem Plasma wurden Aptamere in vierfacher Konzentration im Vergleich zur Konzentration, die im Versuch final vorliegen sollten, beigemischt. Die finale Aptamerkonzentration sollte bei 31,6 nM liegen, also musste das Plasma 126,4 nM enthalten. In der Messung wurde nur ein Viertel des Hirudinplasmas mit drei Vierteln eines frisch aufgetauten Poolplasmas gemischt, welches auf diese Weise neue und frische Gerinnungsfaktoren beisteuerte. Durch diesen Ablauf waren die Aptamere korrekt konzentriert und die Hirudinkonzentration betrug im Ergebnis 2,5 µg/ml Plasma. Nun lagen dieselben Bedingungen vor, wie im Versuch der IC₅₀-Wert Messung über die Gerinnungszeitmessung. In diesem Versuchsteil wurde die Gerinnungsreaktion über den intrinsischen Weg (Aktin FSL®) gestartet.

Die Stabilitätsmessung über das fluorogene Testsystem wurde für die Aptamere HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G durchgeführt. Zu einem Messzeitpunkt sollten alle Proben zur Messung bereit stehen. Realisiert wurde dies, indem die Plasmaprobe mit der längsten Inkubationszeit 360 Minuten vor dem Messzeitpunkt in das Wasserbad bei 37°C gestellt wurde. Weitere Proben folgten diesem Wert in folgender Reihenfolge: 330, 300, 240, 180, 120, 60 Minuten. Als letzter Wert wurde auch eine 0 Minuten-Probe hinzupipettiert. Zu den Proben der verschiedenen Inkubationszeiten in Doppelwerten wurden auf die Mikrotiterplatte Verdünnungsreihen der drei Aptamere hinzugefügt, um zur Auswertung den Aktivitätsverlust der Aptamere an einer Standardkurve ablesen zu können. Auch die Verdünnungsreihen wurden jeweils in Doppelwerten angelegt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich in den wells 10 µl Hirudinplasma mit 30 µl frisch aufgetautem Poolplasma befanden. Dies entspricht einer finalen Aptamerkonzentration von 31,6 nM und einer finalen Hirudinkonzentration von 2,5 µg/ml. Vom Fluoroscans Ascent-Gerät wurde automatisch die Gerinnungsreaktion über den intrinsischen Gerinnungsweg (Aktin FSL®) ausgelöst.

3.2.2.4 Datenanalyse

Zur Datenanalyse der Versuchsteile des AMAX 190 plus Kugelkoagulometer wurden die verschiedenen Inkubationszeiten der Proben (x-Achse) gegenüber den entsprechenden Gerinnungszeiten der Proben (y-Achse) aufgetragen. Um den Einfluss von längeren Inkubationszeiten auf die Gerinnungsfaktoren beurteilen zu können, wurde jeweils eine Probe mit Inhalt von APC, allerdings ohne Aptamer und eine Probe, in der weder Aptamer noch APC enthalten war, im diesem Versuchsteil zusätzlich gemessen.

Im Versuchsteil über das fluorogene Testsystem wurden anhand der mitgeführten Verdünnungsreihen die entsprechenden Restaktivitäten der inkubierten Proben ermittelt. Es konnte über die Verdünnungsreihe eine Standardreihe gemessen werden, über die auf die Restaktivitäten der Aptamere in den Proben zurückgeschlossen werden konnte.

Auch für die Darstellung der gesamten Stabilitätsversuche der Aptamere wurde die Software Microsoft Excel® 2003 verwendet.

3.2.3 Thrombingenerierung

3.2.3.1 Einleitung

Über die Thrombingenerierung kann das *endogene Thrombinbildungspotential (ETP)* in der Citratplasmaprobe (Poolplasma) bestimmt werden. Sie basiert zwar auch auf der Messung des fluorogenen Testsystems, findet aber im Vergleich zu den Versuchen zur Bestimmung der Stabilität und der IC₅₀-Werte in einem veränderten Versuchsaufbau statt. Auch die zur Auswertung verwendete Software (Thrombinoscope Software) war eine andere.

Dieser Versuchskomplex ist von großer Relevanz, da in den bisher beschriebenen Versuchen die Wirkung gegenüber dem APC in Form von dem Medikament XIGRIS® nachgewiesen werden sollte. Durch die Zugabe von rekombinantem humanem Thrombomodulin (TM) zum Poolplasma

kann die Aktivierung des körpereigenen Protein C zu aktiviertem Protein C durch Thrombin stimuliert werden (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Die Aptamere HS02-44G und 88 können in ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber endogen gebildetem APC verglichen werden. Durch die Verwendung von Faktor VIII-Mangelplasma soll die Wirksamkeit der Aptamergruppe HS02 bei Hämophilie A-Patienten nachgewiesen werden. Im Faktor VIII-Mangelplasma wird zusätzlich die inhibitorische Wirksamkeit der Aptamere untereinander verglichen.

3.2.3.2 Spezielles Testprinzip

Verwendete Reagenzien in diesem Versuch sind in einem Testansatz Citratplasma mit einem aus Phospholipiden und Tissue Factor bestehendem Reagenz (PPP-Reagenz). Parallel dazu wurde auf einer Mikrotiterplatte (MTP), ein Calibratoransatz angelegt in dem Citratplasma mit Thrombin-Calibrator (α_2 -macroglobulin) gemischt wurden. Auch im Versuchsteil der Thrombingenerierung wurde durch die nun folgende Zugabe einer Ca^{2+} -haltigen Komposition (*FluCa-Lösung*) die Gerinnungsreaktion über den exogenen Weg ausgelöst.

Je nach Versuchsaufbau wurden jeweils PPP-Reagenz im Testansatz und Thrombin-Calibrator im Calibratoransatz in die Runden Vertiefungen einer MTP pipettiert. Danach wurde das zu untersuchende Plasma sowohl zum PPP-Reagenz als auch zum Thrombincalibrator hinzugegeben. Die bestückte MTP konnte dann bis zum Versuchsstart in der vorgewärmten Messkammer des Fluorometers bei 37°C inkubiert werden. Die FluCa-Lösung, die im Versuchsablauf als Startreagenz fungierte, bestand aus Fluobuffer, CaCl_2 und fluorogenem Substrat. Vor jedem Versuch musste die FluCa-Lösung neu hergestellt und vorgewärmt werden. Zu Beginn des Versuchs wurde nach einer in den Computer eingegebenen Pipettiervorlage, in jedes der gefüllten Vertiefungen über einen Dispenser FluCa-Lösung zugegeben. Jeweils alle 20 Sekunden fand eine Messung der Fluoreszenz in allen gefüllten Vertiefungen statt.

3.2.3.3 Datenanalyse

Automatisch werden die Messwerte der Fluoreszenz an die Thrombinoscope-Software übertragen. Allerdings wird in der Thrombinoscope-Software die erste Ableitung, das bedeutet, die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit angezeigt. Vorher wurden die Werte im Hinblick auf den inner filter effect mit Hilfe des Thrombin-Calibrators (α_2 -macroglobulin) korrigiert.

Zur Analyse der Messung können mehrere Parameter herangezogen werden. Zur Auswertung kommt der Peak-Wert der Messung, also der höchste Fluoreszenzanstieg pro Zeitintervall in Frage (siehe Abb. 10). Ein besser geeigneter Messparameter ist das endogene Thrombinbildungspotential (*ETP*) als Fläche unter der sich bildenden Kurve in nmol. Es entspricht der absoluten Menge des Thrombins, das im Laufe des Versuchs gebildet wurde (siehe Abb. 10).

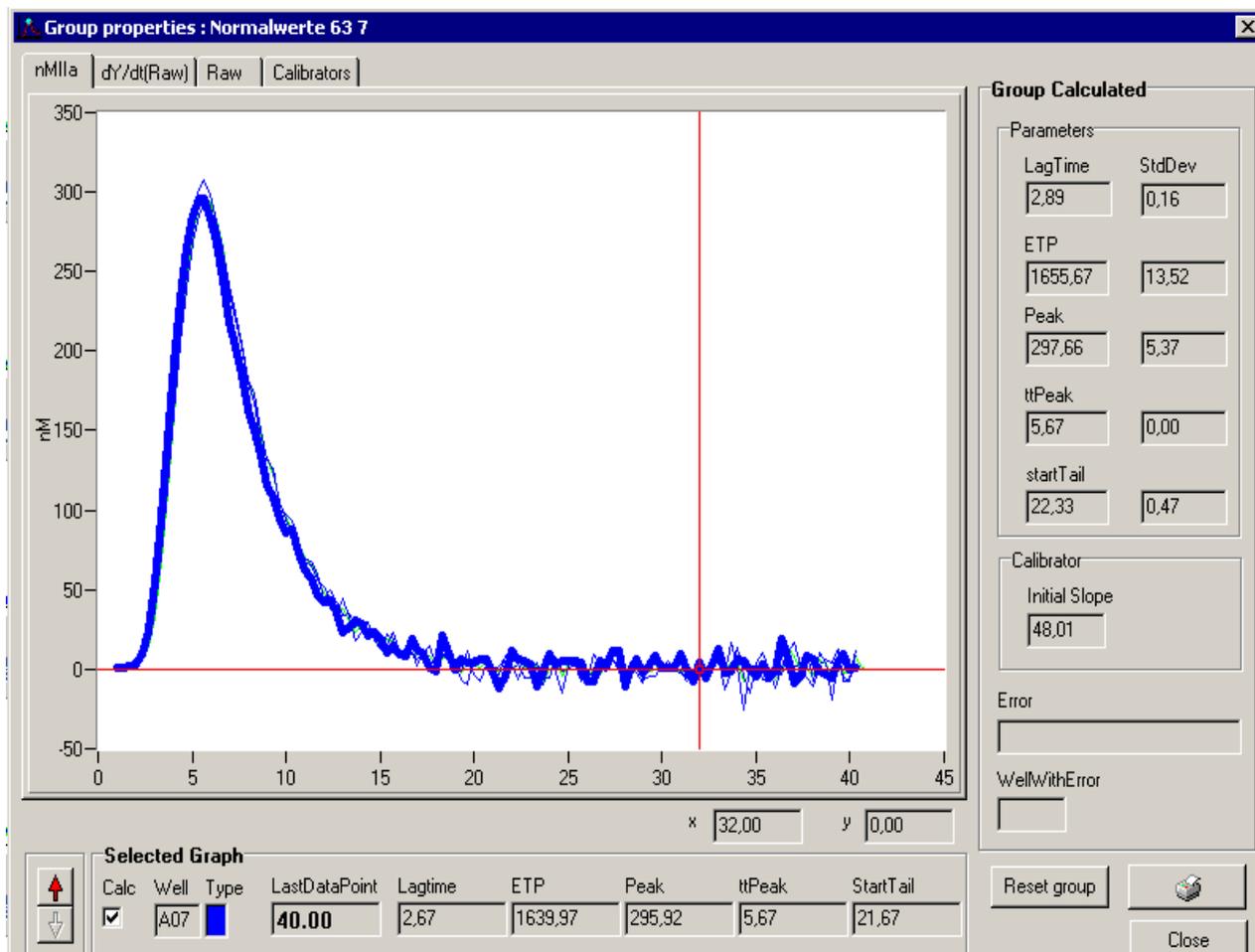


Abb. 10: Beispiel für ein Thrombinogramm eines gesunden Menschen. Auf der x-Achse wird die Zeit in Minuten angezeigt, auf der y-Achse ist die Menge an gebildetem Thrombin in nM dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 IC_{50} -Bestimmungen der Aptamere

4.1.1 IC_{50} -Bestimmung in Citratplasma

Durch Komplexierung der Ca^{2+} -Ionen mit Hilfe von Citrat wurde eine Koagulation in den Proben verhindert. Zuerst wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe des Aptamers HS02-88 vorbereitet und in Poolplasma vorinkubiert. Die höchste Konzentration lag bei einem Wert von 100 nM des Aptamers. Von den Proben entnahm der Pipettierarm des AMAX 190 plus Kugelkoagulometer 25 μ l Probe und gab 25 μ l APC, welches in Tris/HCL-Puffer mit 20 mM $CaCl_2$ gelöst wurde, in einer konstanten Konzentration von 200 nM (100 nM) hinzu. Die Gerinnungsreaktion wurde über die intrinsische Gerinnungskaskade gestartet (siehe Schema 1).

Schema 1:

Schritt 1:	Aptamer +Poolplasma	25 μ l
Schritt 2:	+APC (200 ng/ml) + $CaCl_2$ (20 mM)	25 μ l
Schritt 3:	+Aktin FS®	50 μ l

Ein leicht abgeänderter Versuchsaufbau unterschied sich nur darin, dass sich kein Calcium in der APC-Probe (200 nM), in Tris/HCL-Puffer gelöst, befand. Es wurde stattdessen ein Calciumchlorid-Reagenz zum Starten der Gerinnungsreaktion hinzugefügt (siehe Schema 2).

Schema 2:

Schritt 1:	Aptamer +Poolplasma	25 μ l
Schritt 2:	+APC (200 ng/ml)	25 μ l
Schritt 3:	+Aktin FS®	50 μ l
Schritt 4:	+ $CaCl_2$ (25 mM)	50 μ l

In einem dritten Versuch wurde das Aptamer HS02-88 (ab einer Konzentration von 316nM) zuerst mit APC in einer Tris/HCL-Pufferlösung vorinkubiert (siehe Schema 3). Calciumchlorid (25 mM) startete die Gerinnungsreaktion.

Schema 3:

Schritt 1:	Aptamer +APC (200 ng/ml)	25 µl
Schritt 2:	+Poolplasma	25 µl
Schritt 3:	+Aktin FS®	50 µl
Schritt 4:	+CaCl ₂ (25 mM)	50 µl

Dem APC-Aptamer-Gemisch wurde in einem vierten Versuch 1 mM Calciumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid hinzugegeben. Außerdem wurde das Pipettierschema etwas variiert. Damit das Aptamer an das APC binden konnte, wurde das erste Reagenz für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor für weitere 3 Minuten Poolplasma hinzugegeben wurde. Bei diesem Versuch wurde eine lineare Verdünnungsreihe der Aptamerkonzentration angelegt, ausgehend von 400 nM. Dieser Versuch wurde mit den fünf HS02-Aptameren nach Schema 4 durchgeführt.

Schema 4:

Schritt 1:	Aptamer +APC (200 ng/ml) +MgCl ₂ (1 mM)	
	+CaCl ₂ (1 mM)	25 µl
Schritt 2:	+Poolplasma	25 µl
Schritt 3:	+Aktin FS®	50 µl
Schritt 4:	+CaCl ₂ (25 mM)	50 µl

In den ersten Versuchsabläufen (Schemata 1 und 2) konnte die Gerinnungszeit durch Blockierung des APCs durch die Aptamere nur in sehr hohen Konzentrationen verkürzt werden. Zwar war es möglich bei einer Konzentration der Aptamere von 31,6 nM eine Verkürzung der Gerinnungszeit nachzuweisen, doch selbst bei einer Konzentration bis 316 nM konnte die Wirkung der Aptamere nicht vollständig aufgehoben werden.

Positiv wirkte sich eine gemeinsame Vorinkubation der Aptamere mit APC aus (siehe Schema 3), doch führte auch dieser Versuchsaufbau zu keiner signifikanten Inhibition der Aptamere (Müller et al., 2009).

Erst die Zugabe von Calciumchlorid (1 mM) und Magnesiumchlorid (1 mM) in die Mischung von Aptamer und APC, wie in Schema 4 beschrieben, führte zu einer deutlichen Hemmung des APCs. Dies bedeutet, dass die Bindung der HS02-Aptamere zum APC Ca²⁺ und Mg²⁺ abhängig sein muss.

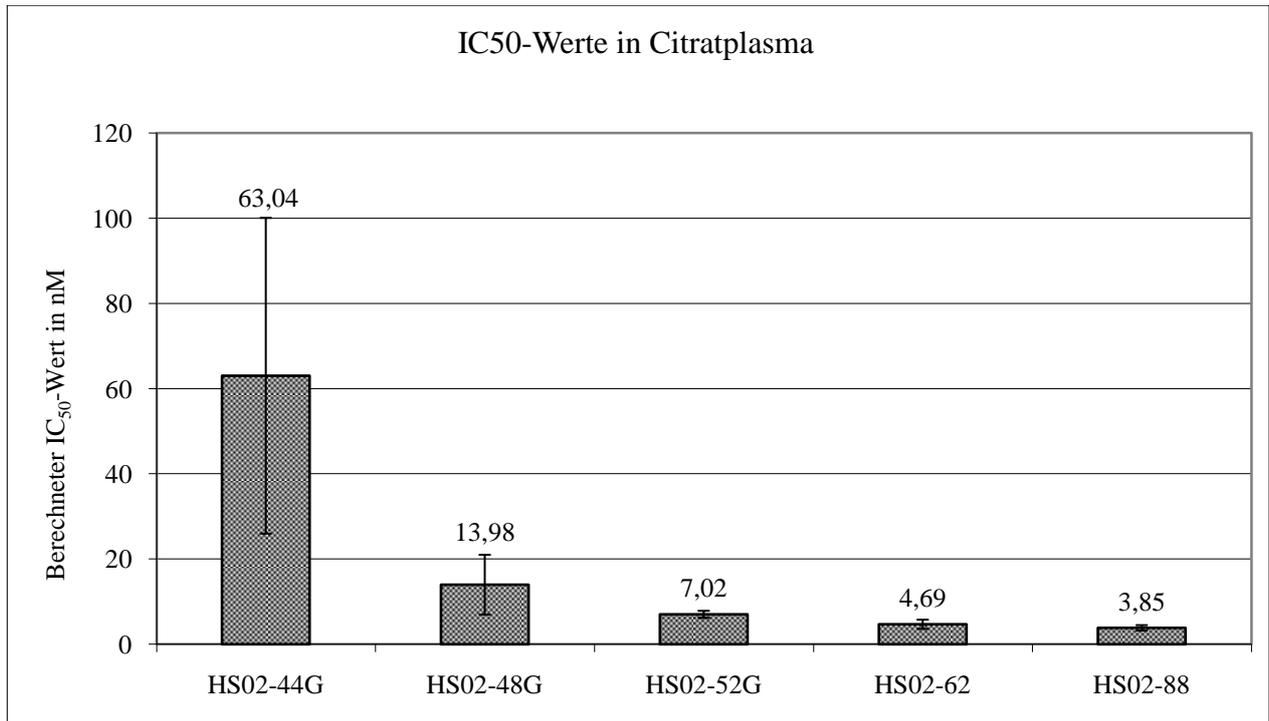


Abb. 11: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der Aptamere gegenüber APC in Citratplasma bei Vorinkubation der Aptamere mit APC in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ und MgCl₂.

Das Ergebnis aus Schema 4 zeigte, dass die hemmende Wirkung umso größer war, je mehr Nukleotide das Aptamer besaß (siehe Abb. 11). So wurde für das Aptamer HS02-88 die stärkste inhibitorische Wirkung ermittelt, während das Aptamer HS02-44G erst in höheren Konzentrationen eine ähnlich gut hemmende Wirkung im Vergleich zu den anderen Aptameren aus der Gruppe aufwies (siehe Abb. 11). Jedoch konnten selbst die Aptamere HS02-48G und HS02-52G bei einer Konzentration von 400 nM nahezu die komplette Wirkung des APCs aufheben, so dass die Gerinnungszeit so verkürzt war, als sei kein APC in der Probe enthalten gewesen. Die anderen Aptamere inhibierten bei dieser Konzentration nur ca. 90% der APC-Wirkung.

4.1.2 IC₅₀-Bestimmung in Heparinplasma

Die Unterbindung der Blutgerinnung wurde allein durch die hemmende Wirkung des Heparins auf die plasmatische Gerinnung verursacht, die eine 700-1000fache Verstärkung der

Antithrombin-Wirkung besitzt (Weiss und Jelkmann, 2000). In dem gesamten Versuchsablauf wurden die Aptamere mit APC vorinkubiert.

In Versuchen, die vorausgingen, wurde eine Aktivierungsstrategie sowohl über den intrinsischen (Aktin FS®) als auch über den extrinsischen Gerinnungsweg (Innovin®) geprüft. Da Heparin mit dem Aptamer um die Bindungsstelle am APC konkurriert (Müller et al., 2009), sollte in einem ersten Versuch die hemmende Wirkung des Heparins durch Polybren (Hexadimethrinbromid), welches ein Antidot zu Heparin darstellt, aufgehoben werden. Das positiv geladene Polybren war dazu gedacht, die Heparin-Wirkung im Plasma aufzuheben, um die Wirkung des APC in einem aPTT-basierten Test zu überprüfen. Es stellte sich heraus, dass die Ergebnisse in diesem Testansatz nicht reproduzierbar waren. Auch der Versuchsansatz den Start der Reaktion über den intrinsischen Aktivierungsweg zu wählen konnte ebenfalls keine stabilen Ergebnisse erzielen.

Für den Versuch nach Schema 5 musste in vorhergehenden Versuchen eine vorteilhafte Innovin®-Konzentration ermittelt werden. Die verwendeten Aptamerproben wurden linear in Tris/HCL-Puffer verdünnt, ausgehend von einer Konzentration von 400 nM.

Schema 5:

Schritt 1:	Aptamer +APC (300 ng/ml) +CaCl ₂ (1 mM)	
	+MgCl ₂ (1 mM)	20 µl
Schritt 2:	+Heparinplasma	30 µl
Schritt 3:	+Innovin® (1/10 verdünnt)	60 µl

In der Versuchsauswertung des Versuchs nach Schema 5 wurde deutlich, dass in Ca²⁺-haltigem Plasma die gemessenen Aptamere HS02-44G, 48G, 52G, 62 und 88 vergleichbare IC₅₀-Werte besaßen. Der Aspekt, dass die IC₅₀-Werte aller Aptamere niedrig ausfielen, lässt darauf schließen, dass die Aptamere sehr affin an das APC binden konnten (siehe Abb. 12).

Die niedrigsten IC₅₀-Werte und damit die höchste Inaktivierungsrate bei einer Konzentration der Aptamere von 400 nM besaßen die Aptamere HS02-48G (IC₅₀ 2,72 nM) und HS02-52G (IC₅₀ 2,09 nM) (siehe Abb. 13). Jedoch war eine absolute Hemmung des APCs (0%-Restaktivität) auch bei 400 nM nicht zu erreichen (siehe Abb. 13). Etwas höhere IC₅₀-Werte wurden bei wiederholten Messungen für das Aptamer HS02-88 festgestellt.

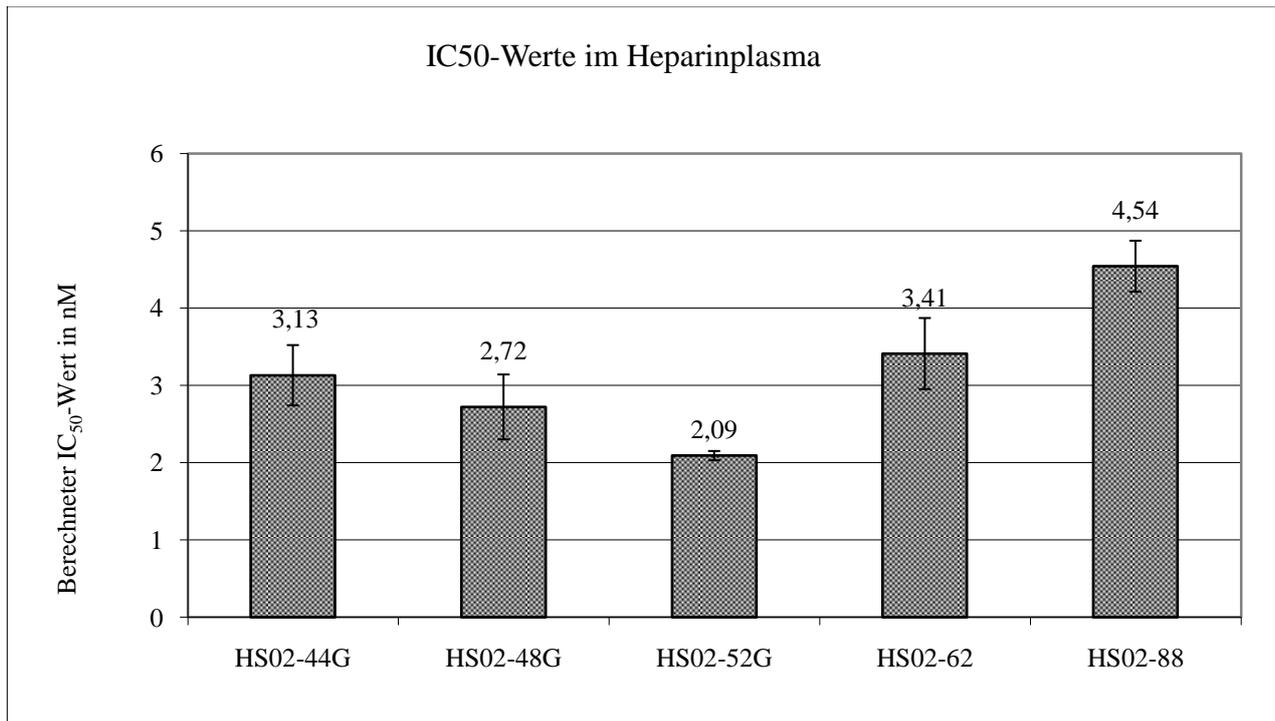


Abb. 12: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Aptamere gegenüber APC in Heparinplasma bei Vorinkubation der Aptamere mit APC.

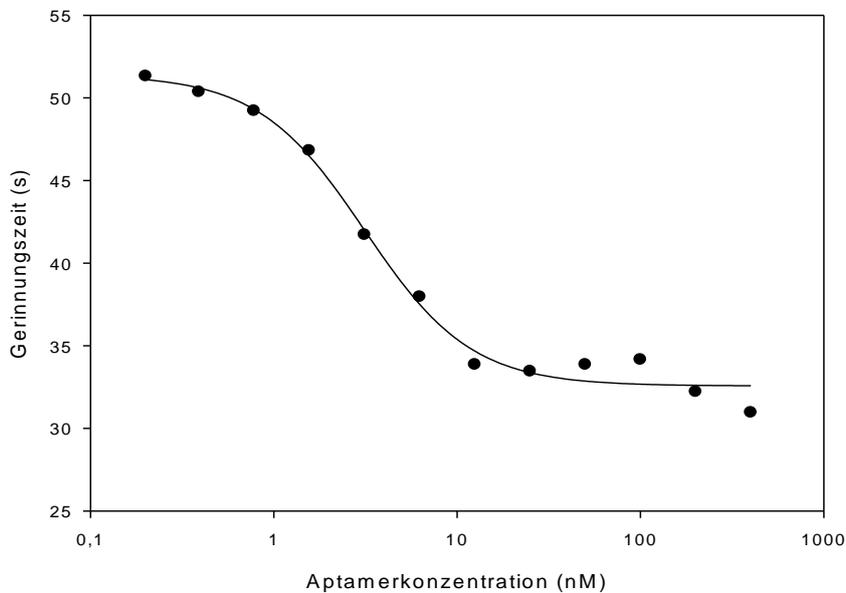


Abb. 13: Einfluss der Konzentration des Aptamers HS02-44G auf die durch APC verlängerte Gerinnungszeit. Die x-Achse stellt die Konzentrationen des Aptamers in einer logarithmischen Skalierung dar. Die y-Achse zeigt die zugehörigen Gerinnungszeiten über den extrinsischen Gerinnungsweg.

4.1.3 IC₅₀-Bestimmung in Hirudinplasma

Das Hirudin hemmt selektiv Thrombin und interagiert nicht mit dem Protein C-System wie das Heparin (Markwardt, 1994; Weitz und Crowther, 2002). Im Gegensatz zur Messung in Citratplasma wurde in diesem Versuch die physiologische Ca²⁺-Konzentration beibehalten. Da diejenige Konzentration, die einerseits ausreicht um ein Plasma zu antikoagulieren andererseits so niedrig ist, eine detektierbare Gerinnungsreaktion auszulösen, nicht bekannt war, musste der optimale Konzentrationsbereich in einem ersten Versuch mit aufsteigender Hirudinkonzentration in Poolplasmaproben mit zugefügten Ca²⁺-Ionen (20 mM) ermittelt werden. Die Ca²⁺-Ionen mussten hinzugegeben werden, um eine Aufhebung der Antikoagulation durch die Ca²⁺-Komplexierung zu erzielen.

In Schema 6 wurde eine Konzentration von 5 µg Hirudin pro ml Plasma verwendet (2,5 µg Hirudin/ml Vollblut bei einem Hämatokrit von ungefähr 50%). Die Konzentration des APCs lag konstant bei 200 ng/ml. Die Aptamerverdünnungsreihe und das Innovin®-Reagenz wurden in Tris/HCL-Puffer gelöst.

Schema 6:

Schritt 1:	Aptamer +APC (200 ng/ml) (4,16 nM) +CaCl ₂ (1 mM)	
	+MgCl ₂ (1 mM)	20 µl
Schritt 2 :	+Hirudinplasma (5 µg/ml)	30 µl
Schritt 3:	+Innovin® (1/8 verdünnt)	60 µl

Eine grundsätzliche Änderung wurde in Schema 7 eingeführt. Im Ablauf wurde in das Hirudinplasma zuerst APC hinzugegeben und danach das Aptamer. Dieser Versuch ist sehr wichtig, da er eine Situation simuliert, in der man das Aptamer als Antidot für therapeutisch verwendetes APC (XIGRIS®) einsetzt. Es wurde eine Hirudinkonzentration von 10 µg/ml Plasma und eine durch Tris/HCL-Pufferlösung ½ verdünntes Innovin®-Reagenz verwendet.

Schema 7:

Schritt 1:	APC (400 ng/ml) (8,32 nM) +CaCl ₂ (2 mM)	
	+MgCl ₂ (2 mM)	10 µl
Schritt 2:	+Hirudinplasma (10 µg/ml)	30 µl
Schritt 3:	+Aptamer	10 µl

Schritt 4: +Innovin® (1/2 verdünnt)

60 µl

Aus dem Versuch nach Schema 6 ließen sich sehr niedrige IC_{50} -Werte für alle Aptamere der Gruppe HS02 errechnen, die in *Abbildung 14* dargestellt werden. Das Aptamer HS02-62 besaß den niedrigsten IC_{50} -Wert. Jedoch lagen die IC_{50} -Werte der Aptamere HS02-48G und HS02-52G etwas niedriger als die Werte der Aptamere HS02-44G und HS02-88. Es zeigte sich im Ergebnis eine Tendenz, dass die errechneten IC_{50} -Werte in Hirudinplasma gegenüber den Werten in Heparinplasma verringert waren. Das bedeutet, dass die Konzentrationen der Aptamere im Hirudinplasma noch weiter gesenkt werden können, um eine vergleichbare Wirkung zu der in Heparinplasma zu erreichen. Eine Konzentration von 400 nM reichte allen Aptameren aus, um die komplette Wirkung des APCs auf die Gerinnung aufzuheben (Ergebnis nicht abgebildet).

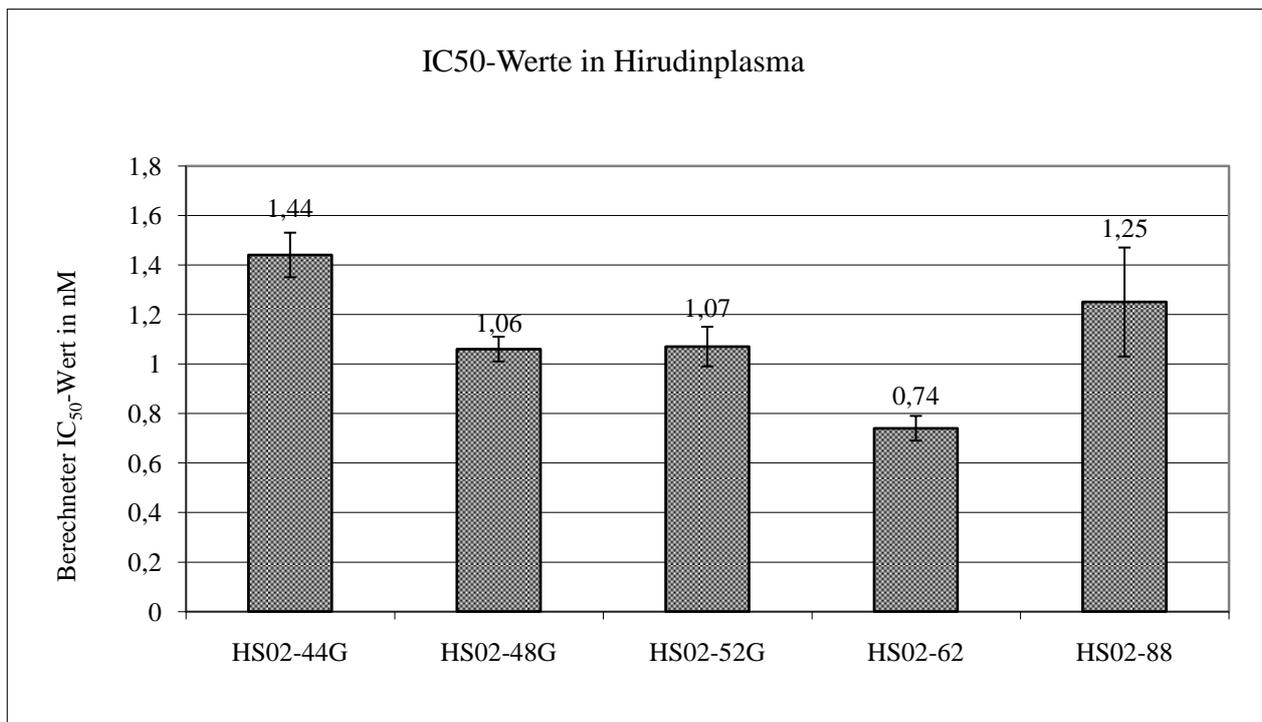


Abb. 14: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Aptamere gegenüber dem APC in Hirudinplasma mit Vorinkubation der Aptamere mit APC.

Der Versuch nach Schema 7 ergab folgendes Ergebnis: Während sich für die Aptamere HS02-48G und HS02-52G mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) errechnen ließen, die sich von den Konzentrationen des Versuchs nach Schema 6 kaum unterschieden, besaßen die Aptamere

HS02-44G, HS02-62 und HS02-88 IC_{50} -Werte, die im Vergleich zu den Aptameren HS02-48G und HS02-52G in etwa 10fach höher lagen. Vergleicht man den Aufbau der Versuche (Schema 6 und 7) so wird deutlich, dass der Unterschied der IC_{50} -Werte als Konsequenz auf den Einfluss der Vorinkubation der Aptamere mit dem APC gesehen werden musste. Die Ergebnisse werden in *Abbildung 15* zusammen mit den aus Kapitel 4.1.4 in Hirudinvollblut berechneten IC_{50} -Werten dargestellt.

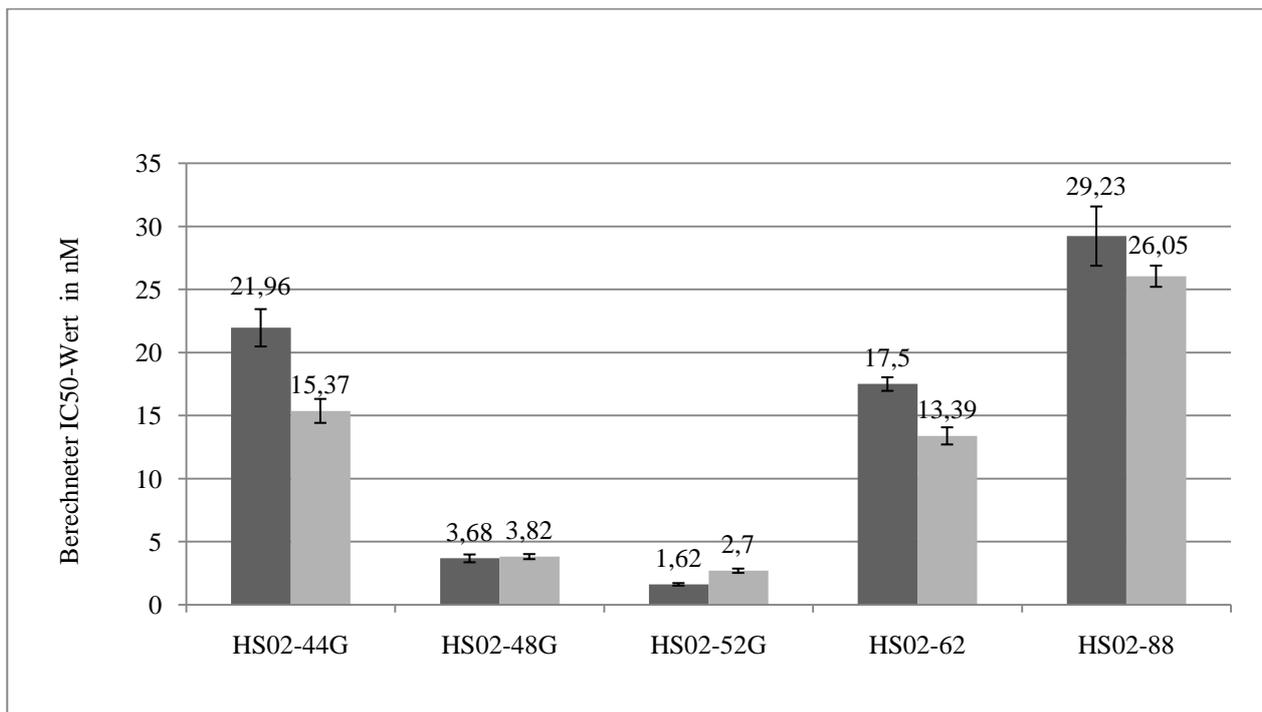


Abb.15: Mittlere Inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Aptamere gegenüber APC in Hirudinplasma (dunkelgrau) und Hirudinvollblut (hellgrau). Im Ablauf wurde in das Hirudinplasma zuerst APC hinzugegeben und danach erst die Aptamere hinzugefügt.

4.1.4 IC_{50} -Bestimmung in Hirudinvollblut

Bisher wurden alle Messungen nur in Plasma durchgeführt. Um aber herauszufinden, ob die zellulären Anteile des Blutes die APC-Aptamer-Wechselwirkung beeinflussen, wurde dieses Experiment mit Hirudin koaguliertem Vollblut angelegt. Sollte das Vollblut einen Einfluss auf die Bindung der Aptamere haben, so müssten sich die IC_{50} -Werte gegenüber den IC_{50} -Werten aus dem Plasma unterscheiden. Dieser Versuch spiegelte realistisch eine mögliche therapeutische Gabe des Aptamers wieder, denn auch in vivo kommt das Aptamer mit Vollblut in Kontakt.

Wie Schema 8 zeigt, wurde eine Hirudinkonzentration von 4,5 µg/ml Vollblut verwendet. Durch die Einbeziehung des zellulären Anteils des Blutes in den Versuch musste die Hirudinkonzentration pro Volumeneinheit nur halb so hoch gewählt werden, wenn von einem Hämatokrit von ca. 50% ausgegangen wird. Im Versuchsablauf musste darauf geachtet werden, dass die Vollblutproben von Zeit zu Zeit verrührt wurden, damit sich die zellulären Anteile nicht auf dem Boden absetzen konnten und der Pipettierarm des AMAX 190 plus Kugelkoagulometer vor allem plasmatische Anteile entnahm. Im Ablauf wurde auch in Schema 8 zuerst APC zu dem Hirudinvollblut zugegeben, bevor das Aptamer in Tris/HCL-Puffer gelöst folgte.

Schema 8:

Schritt 1:	Aptamer +APC (700 ng/ml (14,56 nM) +CaCl ₂ (2 mM) +MgCl ₂ (2 mM)	10µl
Schritt 2:	+Hirudin Vollblut (4,5 µg/ml)	30µl
Schritt 3:	+Aptamer	10µl
Schritt 4:	+Innovin® (1/2 verdünnt)	60 µl

Die Messung ergab, in *Abbildung 15* gemeinsam mit den IC₅₀-Werten aus dem Hirudinplasma dargestellt, dass die IC₅₀-Werte in Vollblut mit den IC₅₀-Werten in Hirudinplasma korrelieren. Es ließen sich niedrige Werte für die Aptamere HS02-48G und HS02-52G ermitteln, die somit die höchste inhibitorische Effektivität besaßen. Sie scheinen folglich in kurzer Zeit an das APC binden zu können. Parallel zu Schema 7 aus Kapitel 4.1.3 in Hirudinplasma lagen die IC₅₀-Werte der Aptamere HS02-44G, HS02-62 und HS02-88 signifikant höher als die der Aptamere HS02-52G und HS02-48G. Allerdings fiel im Vergleich zwischen Hirudinvollblut und -plasma auf (siehe Abb.15), dass die IC₅₀-Werte der oben genannten Aptamere tendenziell in Hirudinvollblut etwas niedriger lagen als in Hirudinplasma.

Das Ergebnis dieses Versuchs deutet darauf hin, dass die zellulären Anteile des Vollbluts die Interaktion der Aptamere mit dem APC nicht stören.

4.1.5 IC₅₀-Bestimmung in Hirudinplasma über das fluorogene Testsystem

Sowohl in Schema 9 als auch in Schema 10 wurden die Aptamere in Poolplasma vorinkubiert, das zusätzlich mit Hirudin versetzt wurde. Ein grundlegender Unterschied zu den vorhergehenden

Versuchen war, dass in diesem Versuch die Aptamere in das Hirudin enthaltende Plasma vorgelegt wurden, bevor durch den Dispenser zum Reaktionsstart unter anderem APC hinzugegeben wurde.

In Schema 9 wurden Innovin® und Ca^{2+} -Ionen als Startreagenzien verwendet, wodurch der extrinsische Gerinnungsweg aktiviert wurde. Aktin FSL® und Ca^{2+} -Ionen lösten die Gerinnungskaskade über den intrinsischen Aktivierungsweg aus (Schema 10). Die Aptamerverdünnungsreihe begann in Schema 9 bei einer Konzentration von 316 nM und wurde halblogarithmisch verdünnt. Zu der Verdünnungsreihe in Schema 10 wurde zusätzlich ein höherer Messwert hinzugefügt (1000 nM) und ein niedriger Messwert entfiel. Ein weiterer Unterschied zwischen den Schemata war die Hirudinkonzentration in der Mischung aus Poolplasma und Aptameren. In Schema 10 wurde eine im Vergleich zu Schema 9 niedrigere Hirudinkonzentration von 2,5 µg/ml verwendet.

Schema 9:

Schritt 1:	Poolplasma +Hirudin (8 µg/ml) +Aptamer	40 µl
Schritt 2:	+FluCa-Gemisch (700 µl Innovin®, 630 µl Fluobuffer, 70 µl CaCl_2 (1 M), 9µl fluorogenes Substrat, 4,2 µl APC (300 ng/ml))	20 µl

Schema 10:

Schritt 1:	Poolplasma +Hirudin (2,5 µg/ml) +Aptamer	40 µl
Schritt 2:	+FluCa-Gemisch (700 µl Aktin FSL®, 630 µl Fluobuffer, 70 µl CaCl_2 (1 M), 9µl fluorogenes Substrat, 5,6 µl APC (400 ng/ml))	20 µl

Ein Vorteil des Versuchs war, dass die Aptamerverdünnungsreihen im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen in einer Messung parallel gemessen werden konnten. Eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die IC_{50} -Werte innerhalb der Aptamergruppe HS02 war dadurch vorherzusehen.

Ein Vorzug dieses Versuchsteils war zusätzlich, dass die Messungen nahezu identisch sowohl über den extrinsischen (Schema 9) als auch über den intrinsischen Gerinnungsweg (Schema 10) ablaufen und gemessen werden konnten. Dadurch war es möglich, die Ergebnisse für die IC_{50} -

Werte der Aptamere über die zwei Gerinnungssysteme gegenüberzustellen und zu vergleichen (siehe Abb. 16). In der Ergebnisauswertung wurde der maximale Fluoreszenzwert von dem minimalen Fluoreszenzwert abgezogen und gegen die Aptamerkonzentrationen in der Software SigmaPlot® aufgetragen. Hierdurch konnten folgende IC_{50} -Werte bestimmt werden: siehe *Abbildung 16*.

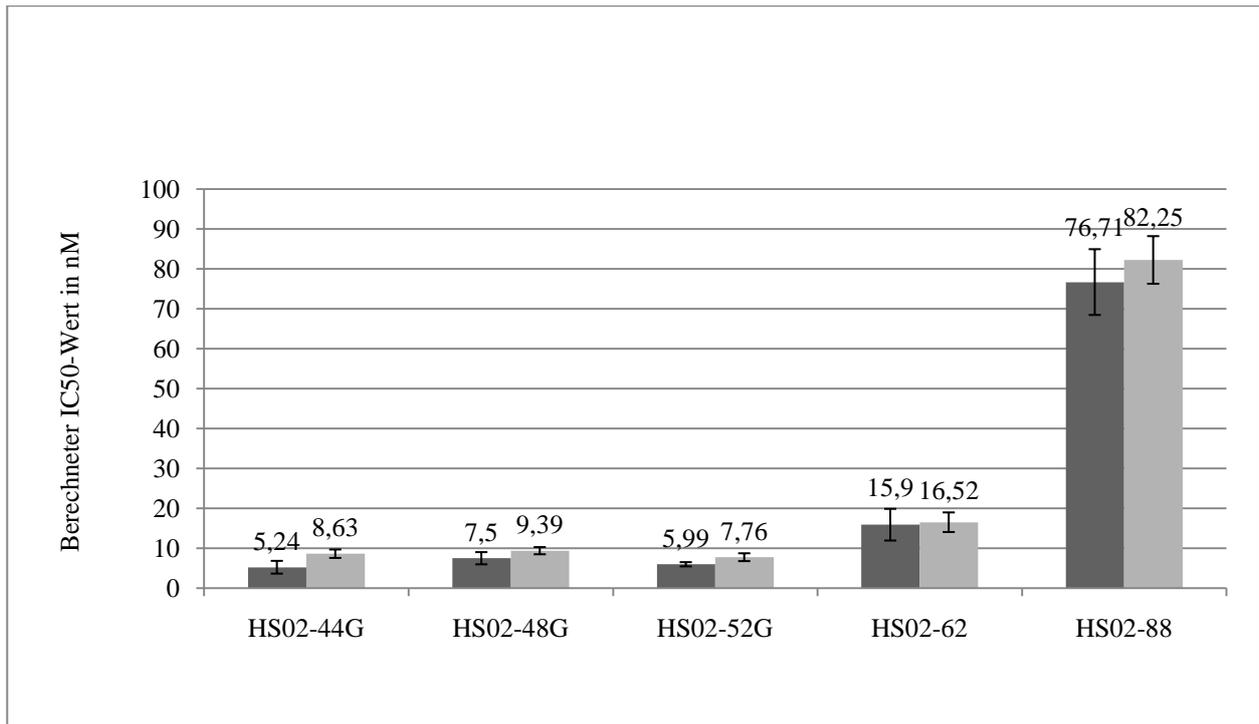


Abb.16:: Darstellung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) der Aptamere gegenüber APC bei der Messung über das fluorogene Testsystem. Die Gerinnung wurde über den extrinsischen Aktivierungsweg (durch Innovin®)(dunkelgrau) und über den intrinsischen Aktivierungsweg (durch Aktin FSL®) (hellgrau) gestartet.

Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) der Aptamere in den beiden Versuchen lagen in einem niedrigen Bereich und bestätigten die Ergebnisse aus den vorhergehenden Versuchen der Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 in denen Hirudin als Antikoagulant verwendet wurde. Die IC_{50} -Werte der Aptamere HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G waren dabei sowohl über das extrinsische als auch das intrinsische Gerinnungssystem am niedrigsten, der IC_{50} -Wert des Aptamers HS02-62 ein wenig höher und der Wert des Aptamers HS02-88 signifikant am höchsten (siehe Abb. 16). Im Vergleich zu den Versuchen im Hirudinplasma (Kapitel 4.1.3) und Vollblut (Kapitel 4.1.4) war festzustellen, dass die IC_{50} -Werte des Aptamers HS02-44G auch

niedrig lagen. Das Aptamer HS02-52G kam im Vergleich zu dem Aptamer HS02-44G trotz eines um 8 Nukleotide längeren DNA-Strangs auf einen ähnlich niedrigen IC_{50} -Wert.

Vergleicht man die beiden Versuche nach Schema 9 und 10 miteinander, zeigt sich ein nahezu paralleles Ergebnis für die IC_{50} -Werte. Die über den intrinsischen Gerinnungsweg gemessenen IC_{50} -Werte lagen etwas höher als die IC_{50} -Werte, die über den extrinsischen Weg ermittelt wurden. Der intrinsische Gerinnungsweg beinhaltet in seiner Gerinnungskaskade die durch APC inhibierten Faktoren Va und VIIIa (Witt und Dörner, 2003). Der extrinsische Gerinnungsablauf schließt allerdings im direkten Ablauf nur den Faktor Va mit ein. Deshalb ist zu überlegen, ob möglicherweise die intrinsische Gerinnungsaktivierung die genauere Testmethode zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des Aptamers im Bezug auf APC war. Da das Tissue Factor-Reagenz (Innovin®) durch Tris/HCL-Puffer verdünnt wurde, wurde nicht auf eine progressive Faktor Xa-Entstehung aus dem TF/Faktor VIIa-Komplex gedrängt. Eine zusätzliche Aktivierung der Gerinnung über den Verstärkerloop (*Amplifier Loop*), über den Faktor IXa mit Faktor VIIIa (intrinsischem Gerinnungsweg), war die Folge (Hemker et al., 2003). Zusammenfassend ist zu sagen, dass bei einer Verwendung von niedrigen Konzentrationen des Tissue Factors zur Auslösung der extrinsischen Gerinnungsaktivierung auch der Faktor VIIIa mitberücksichtigt wird. Der Zeitpunkt des Einsetzens des Verstärkerloops war im Verlauf der Kurve im fluorogenen Testsystem zu erkennen. Dies findet sich beispielhaft in *Abbildung 17* dargestellt.

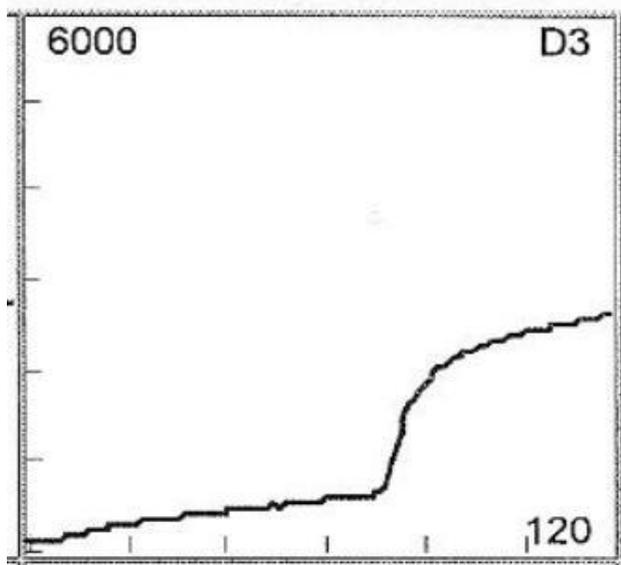


Abb. 17: Beispiel für eine zusätzliche Aktivierung der Gerinnung über den Verstärkerloop (Amplifier Loop), der in diesem Graphen nach ca. 70 „Counts“ einsetzt. In diesem Graphen wurde eine Konzentration von 10 nM des Aptamers HS02-52G verwendet. Die x-Achse wird mit „Counts“ beschriftet (120 „Counts“ entsprechen einer Messzeit von 40 Minuten). Auf der y-Achse werden die relativen Fluoreszenzeinheiten dargestellt.

4.2 Stabilität der Aptamere in Plasma

4.2.1 Stabilität in Citratplasma

Im Mittelpunkt dieses Versuchs stand die Frage, ob und wie anfällig die gegen das APC gerichteten DNA-Aptamere gegenüber DNAsen im Citratblut, also in einem Ca^{2+} -freien Milieu, sind. Das Hauptaugenmerk in diesem Versuchsteil lag auf dem kürzesten Aptamer der Gruppe, dem Aptamer HS02-44G als Minimalmotiv (Salehi, 2007), weil ein Wirkungsverlust bei diesem Aptamer schon dann eintritt, wenn nur ein endständiges Nukleotid durch eine Exonuklease entfernt würde. Im Gegensatz dazu könnten bei den übrigen Aptameren der Gruppe HS02 einige Nukleotide durch Nukleasen entfernt werden, ohne dass die APC-bindende Domäne beeinträchtigt wäre. Die Affinität bliebe erhalten.

Vier Reagenzien wurden nach angegebenem Schema 11 im ersten Versuchsteil pipettiert. Über die Zugabe von CaCl_2 und Hirudin in das APC-Reagenz herrschte in der Probe kurzzeitig ein Überangebot an Ca^{2+} -Ionen und gleichzeitig wurde durch Hirudin antikoaguliert. Dieser Versuch wurde mit allen HS02-Aptameren in Tris/HCL-Puffer gelöst in konstanter Konzentration (600 nM) durchgeführt. Das Innovin®-Reagenz wurde durch Tris/HCL-Puffer 1/8 verdünnt.

Schema 11:

Schritt 1:	Aptamer (600nM)	10 μl
Schritt 2:	+Poolplasma	30 μl
Schritt 3:	<i>Inkubation für 0, 60, 120, 180, 300, 480 und 600 s</i>	
Schritt 4:	+Hirudin (10 $\mu\text{g/ml}$) + CaCl_2 (40 mM)	
	+APC (800 ng/ml (16,64 nM))	10 μl
Schritt 5:	+Innovin® (1/8 verdünnt)	60 μl

Im Versuchsteil zur Untersuchung der Haltbarkeit der Aptamere bei längeren Inkubationszeiten waren nur drei Reagenzien notwendig, da die Aptamere im Vorhinein in das Poolplasma hineinpipettiert wurden (siehe Schema 12).

Schema 12:

Schritt 1:	Aptamer (200 nM) +Poolplasma	30 µl
Schritt 2:	<i>Inkubation für 0, 30, 90, 120 und 180 min</i>	
Schritt 3:	+Hirudin (5 µg/ml) +CaCl ₂ (20 mM)	
	+APC (400 ng/ml (8,32 nM))	20 µl
Schritt 4:	+Innovin® (1/8 verdünnt)	60 µl

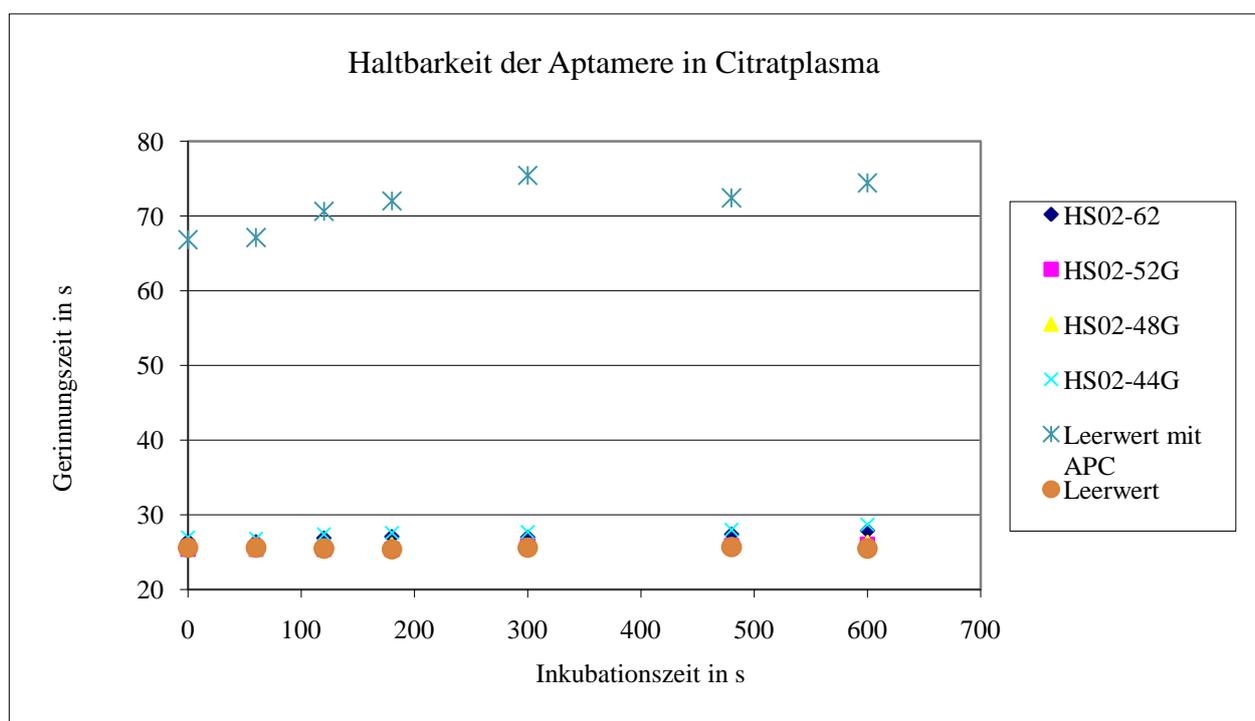


Abb.18: Einfluss von Inkubationszeiten der in der Legende angegebenen Aptamere in Citratplasma auf die Gerinnungszeit. Eine automatische Inkubation bei 37°C ist über den AMAX 190 plus Kugelkoagulometer bis zu 600 s möglich.

Im Versuch nach Schema 11 wurde deutlich, dass im Ca²⁺-freien Plasma nahezu keine Inaktivierung der Aptamere statt fand (siehe Abb. 18). Alle Aptamere besaßen nach 600 Sekunden Inkubation im Citratplasma eine in etwa vergleichbare inhibitorische Wirkung, wie nach sofortiger Gerinnungszeitmessung. Zusätzlich war festzustellen, dass sich fast identische

Gerinnungszeiten der Aptamere zu einem mitgeführten Leerwert (ohne Aptamer und ohne APC) ergaben (siehe Abb. 18).

Im zweiten Versuchsteil nach Schema 12 war ein Anstieg der Gerinnungszeit bei allen Aptameren gleichmäßig von einer Gerinnungszeit von ca. 25 Sekunden zum Zeitpunkt 0 Minuten Inkubation auf ca. 30 Sekunden Gerinnungszeit bei 180 Minuten Inkubation festzustellen. Die Gerinnungszeit des mitgeführten Leerwerts ohne Inhalt von Aptameren und ohne APC stieg stetig an. Zu beobachten war, dass das Aptamer HS02-62 als erstes Aptamer nach 180 Minuten an Aktivität zu verlieren schien (siehe Abb. 19).

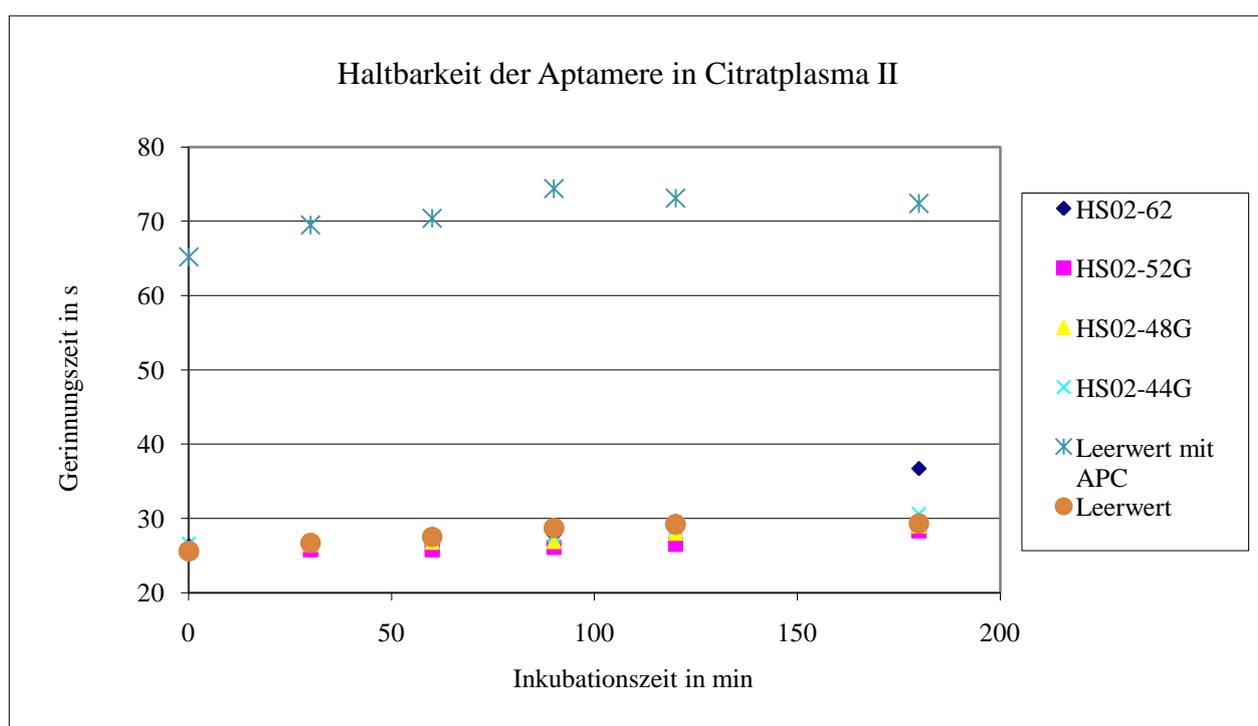


Abb. 19: Einfluss von Inkubationszeiten auf die prokoagulatorische Wirkung der in der Legende angegebenen Aptamere in Citratplasma. Alle Aptamere liegen in einer Konzentration von 200 nM vor.

4.2.2 Stabilität in Heparinplasma

Dieser Versuch sollte die Haltbarkeit der Aptamere in Ca^{2+} -Ionen enthaltendem Heparinplasma bis zu einer Inkubationsdauer von 600 Sekunden ermitteln. Die Aptamere wurden in Tris/HCL-Puffer gelöst und im Versuch in gleicher Höhe bei 500 nM konzentriert. Die Konzentration wurde so gewählt, dass sich bereits eine minimale Konzentrationsänderung auf die

Gerinnungszeit auswirken sollte. Auch das Innovin®-Reagenz wurde durch Tris/HCL-Pufferlösung verdünnt.

Schema 13:

Schritt 1:	Aptamer (500 nM) +CaCl ₂ (1 mM) +MgCl ₂ (1 mM)	10 µl
Schritt 2:	+Heparinplasma	30 µl
Schritt 3:	<i>Inkubation für 0, 60, 120, 180, 300, 480, 600 s</i>	
Schritt 4:	+APC (600 ng/ml (12,48 nM)) +CaCl ₂ (1 mM)	
	+MgCl ₂ (1 mM)	10 µl
Schritt 4:	+Innovin® (1/10 verdünnt)	60 µl

Wie in *Abbildung 20* gezeigt, kam der Versuch nach Schema 13 zum Ergebnis, dass das Aptamer HS02-44G in seiner Konzentration und damit in seiner prokoagulatorischen Wirkung im Vergleich zu den anderen Aptamern über die Zeit abfällt. Zuerst verlängerte sich die Gerinnungszeit mit der Inkubationszeit rapide und näherte sich dann einer Gerinnungszeit von ca. 45 Sekunden an. Doch auch längere Inkubationszeiten schienen keinen größeren Einfluss auf die Aptamerkonzentration zu haben. Dabei ist anzumerken, dass der Wert von 45 Sekunden nicht der Gerinnungszeit des Leerwerts mit APC und ohne Aptamer entsprach (siehe Abb. 20). Das bedeutet, dass weiterhin eine inhibitorische Aktivität des Aptamers bestand, die allerdings vermindert war. Die Wirkung der Aptamere HS02-52G, HS02-48G, HS02-62 und HS02-88 war hingegen unbeeinträchtigt.

Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren Versuch nach gleichem Schema (Schema 13) noch einmal überprüft und bestätigt (siehe Abb. 21). Zweifelsfrei konnte nachgewiesen werden, dass das Aptamer HS02-44G an inhibitorischer Wirkung verlor, während das Aptamer HS02-88 stabil blieb.

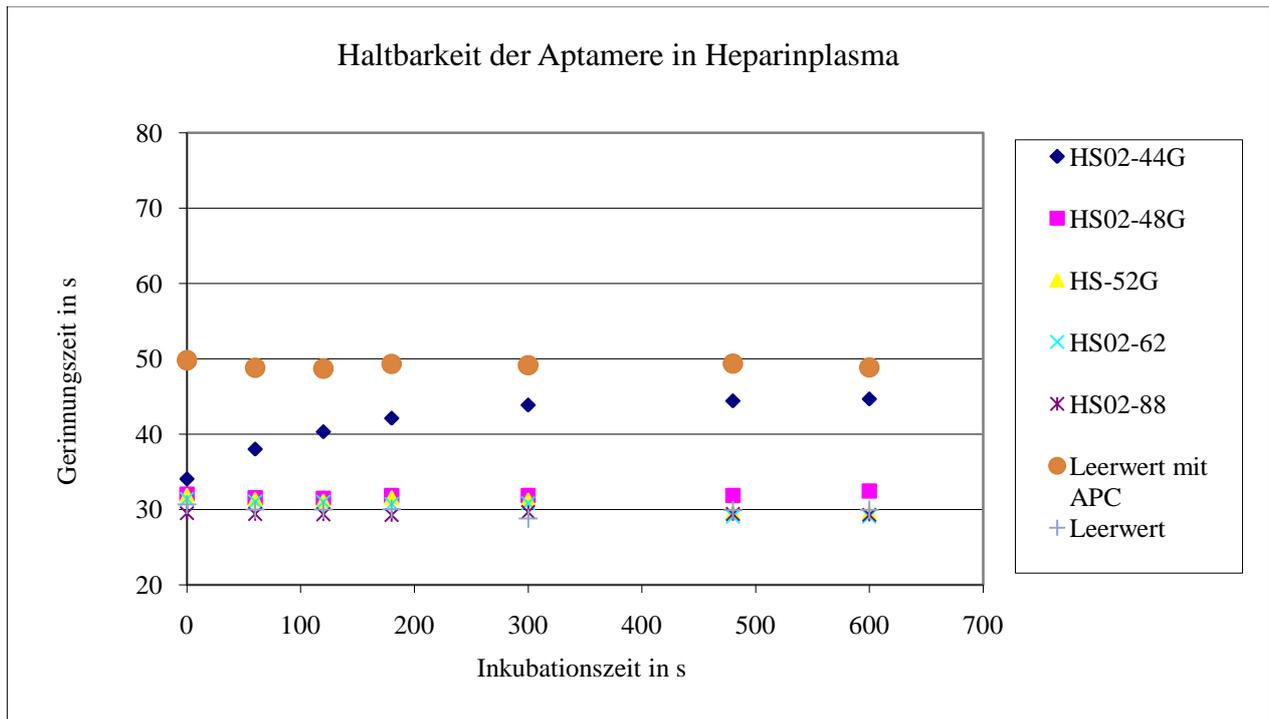


Abb.20: Einfluss von Inkubationszeiten der in der Legende angegebenen Aptamere in Heparinplasma auf die Gerinnungszeit. Eine automatische Inkubation bei 37°C ist über den AMAX 190 plus Kugelkoagulometer bis zu 600 s möglich.

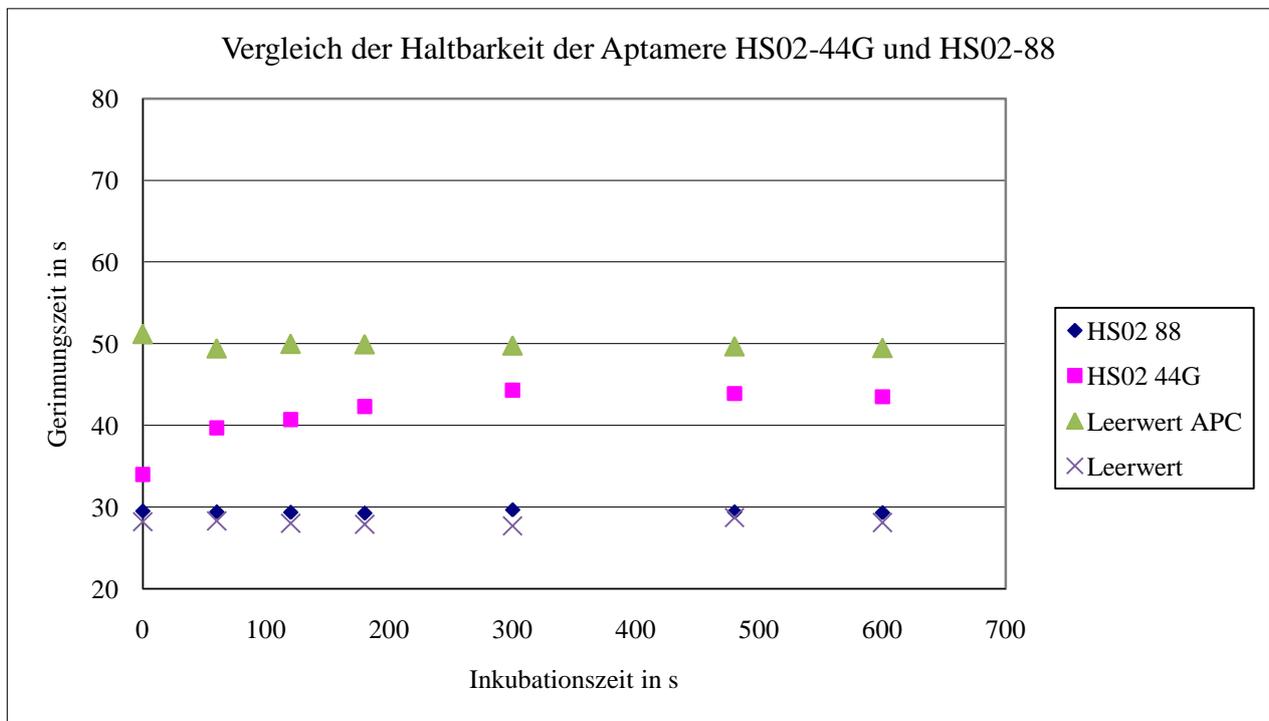


Abb. 21: Vergleich der Haltbarkeit der Aptamere HS02-44G mit dem Aptamer HS02-88 im Bezug auf die Inkubationsdauer in Heparinplasma.

4.2.3 Stabilität in Hirudinplasma

Weiteren Aufschluss über die Stabilität der Aptamere nach Inkubation in Ca^{2+} -Ionen-haltigem Hirudinplasma sollte dieser Versuchsteil geben. Ein erster Versuch wurde mit kurzen Inkubationszeiten bis 600 Sekunden (Schema 14), ein zweiter Versuch mit langen Inkubationszeiten bis 240 Minuten angelegt (Schema 15). Die Konzentrationen in einer Tris/HCL-Pufferlösung wurden erneut bei allen Aptameren gleich gewählt und so konzentriert, dass sich eine geringe Konzentrationsänderung in der Gerinnungszeit bemerkbar machte. Die Zeitmessung wurde durch die Zugabe von 60 μl einer in Tris/HCL-Puffer verdünnten Innovin®-Lösung über den extrinsischen Gerinnungsweg gestartet. Zur Ermittlung der optimalen Aptamer- und APC-Konzentrationen waren einige Vorversuche notwendig.

Für eine zweite Messreihe nach Schema 15 mit längeren Inkubationsdauern der Aptamere in Hirudinplasma wurden Eppendorf®-Cups vorbereitet. In Hirudinplasmaproben wurden drei verschiedene Konzentrationen aller Aptamere (100 nM, 150 nM, 200 nM) gelöst, so dass in der Summe 15 Eppendorf®-Cups vorlagen. Diese 15 Cups wurden zum Zeitpunkt 0, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten aus dem Wasserbad herausgenommen und in den AMAX 190 plus Kugelkoagulometer positioniert. Zu jedem der angegebenen Zeiten fand eine Messung statt.

Schema 14:

Schritt 1:	Aptamer (300 nM) + CaCl_2 (1 mM) + MgCl_2 (1 mM)	10 μl
Schritt 2:	+Hirudinplasma (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	30 μl
Schritt 3:	<i>Inkubation für 0, 60, 120, 180, 300, 480, 600 s</i>	
Schritt 4:	+APC (300 ng/ml (6,24 nM)) + CaCl_2 (1 mM)	
	+ MgCl_2 (1 mM)	10 μl
Schritt 5:	+Innovin® (1/8 verdünnt)	60 μl

Schema 15:

Schritt 1:	Aptamer (100, 150, 200 nM) +Hirudinplasma (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	30 μl
Schritt 2:	<i>Inkubation für 0, 60, 90, 120, 180, 240 min</i>	
Schritt 3:	+APC (200 ng/ml (4,16 nM)) + CaCl_2 (1 mM)	
	+ MgCl_2 (1 mM)	20 μl
Schritt 4:	+Innovin® (1/2 verdünnt)	60 μl

Es zeigte sich, wie in den Versuchen in Kapitel 4.2.2 in Heparinplasma, dass die inhibitorische Aktivität des Aptamers HS02-44G im Verhältnis zur Inkubationsdauer im AMAX 190 plus Kugelkoagulometer über die Zeit abnahm (siehe Abb. 22). Die Gerinnungszeit näherte sich einem Wert an, der sich bei längeren Inkubationen nicht mehr erheblich verlängerte. Dieser Wert entsprach jedoch nicht einer kompletten Inaktivität des Aptamers (siehe Leerwert mit APC, Abb. 22). Die restlichen Aptamere inhibierten die Wirkung des APC über den Zeitraum von 600 Sekunden und blieben somit stabil (siehe Abb. 22). Ein interessanter Aspekt war, dass die Gerinnungszeiten des Aptamers HS02-62 von Beginn des Versuchs an länger waren als die der anderen Aptamere und schlussfolgernd das Aptamer eine geringere inhibitorische Wirkung besaß. Jedoch zeigte das Aptamer HS02-62 über einen Zeitraum von 600 Sekunden keinen Wirkungsabfall.

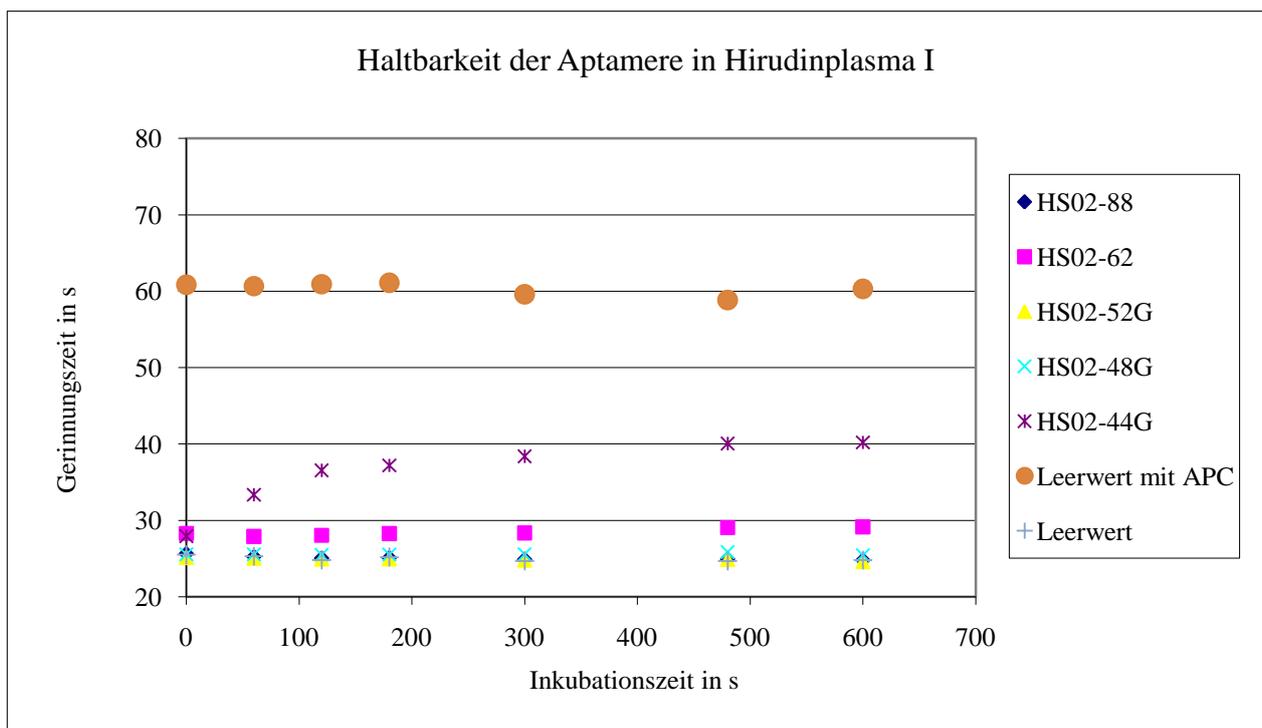


Abb.22: Einfluss von Inkubationszeiten der in der Legende angegebenen Aptamere in Hirudinplasma auf die Gerinnungszeit. Eine automatische Inkubation bei 37°C ist über den AMAX 190 plus Kugelkoagulometer bis zu 600 s möglich.

In *Abbildung 23* werden die Gerinnungszeiten der Aptamere im Vergleich bei einer für alle Proben konstanten Konzentration von 200 nM dargestellt. Die Aptamere HS02-44G und HS02-

62 wiesen im Vergleich zu den anderen Aptameren nach 240 Minuten eine deutlichere Inaktivierung auf. Es fiel auf, dass auch die Wirkung der Aptamere HS02-48G und HS02-52G zwischen einer Inkubation von 180 min und 240 min signifikant abnahm. Als Konsequenz war ein Anstieg der Gerinnungszeit festzustellen. Das Aptamer HS02-88 erwies sich nach 240 min als das stabilste Aptamer der Aptamergruppe (siehe Abb.23).

Im Versuchsablauf nach Schema 15 existierte das Problem, dass das Hirudinplasma für die Messung der Gerinnung über längeren Inkubationszeitraum bei 37°C nicht stabil genug zu sein schien und die Gerinnungsfaktoren ihre Wirkung zu einem Teil verloren. Da aber die Gerinnungszeiten der Aptamerproben deutlicher anstiegen, vor allem bei den längeren Inkubationsdauern, als das bei dem mitgeführten Leerwert der Fall war, musste davon ausgegangen werden, dass die Aptamere an Wirkung verloren. Nach 240 Minuten Inkubation war die Wirkung des Aptamers HS02-44G komplett aufgehoben. Auch das Aptamer HS02-62 besaß eine schwächere Wirksamkeit als die der Aptamere HS02-48G, HS02-52G und HS02-88 (siehe Abb.23).

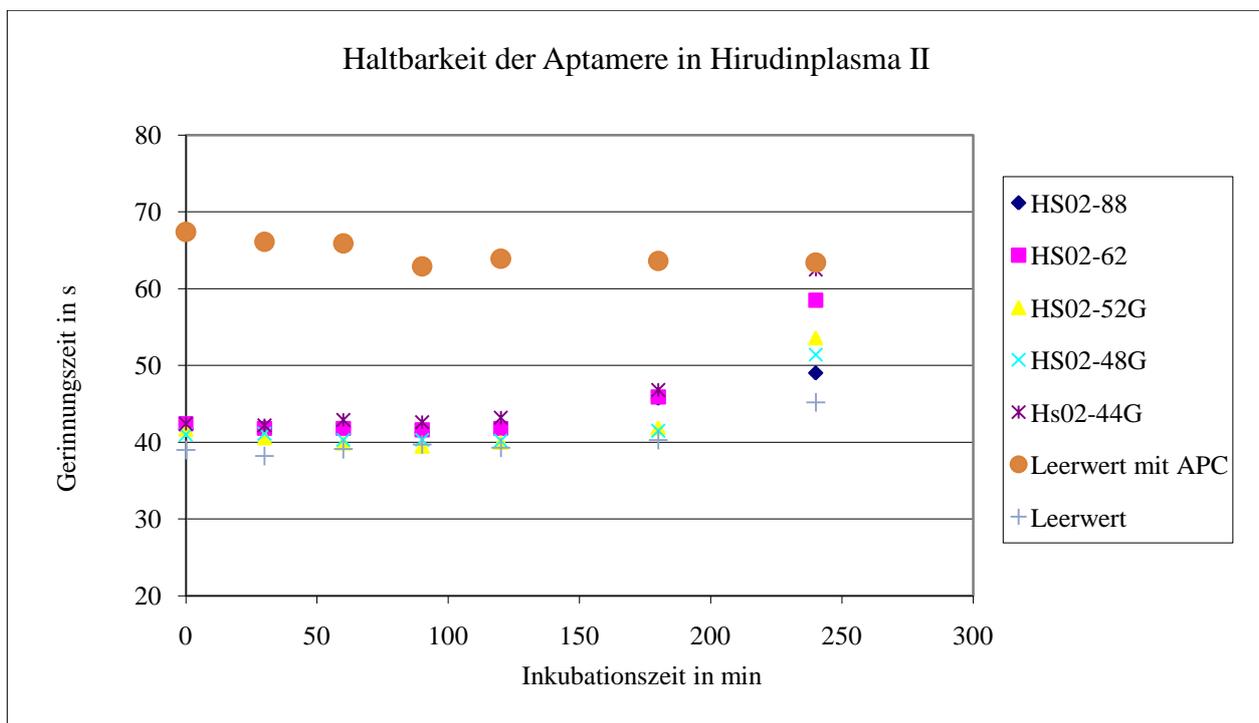


Abb.23: Einfluss von Inkubationszeiten auf die prokoagulatorische Wirkung der in der Legende angegebenen Aptamere in Hirudinplasma. Alle Aptamere liegen in einer Konzentration von 200 nM vor.

4.2.4 Stabilität in Hirudinplasma über das fluorogene Testsystem

Der Versuchsablauf war identisch mit dem Versuch zur IC_{50} -Wert Bestimmung über das fluorogene Testsystem und lief daher nach Schema 10 (siehe Kapitel 4.1.5) ab. Auch in diesem Versuch wurden alle zu messenden Aptamere in einem Ca^{2+} -Ionen enthaltendem Plasma parallel vorinkubiert.

Die Proben, welche Poolplasma, Hirudin (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und Aptamere (126,4 nM) enthielten wurden für 360, 300, 240, 180, 120, 60 und 30 Minuten vor Messbeginn zum Inkubieren in ein Wasserbad bei 37°C gestellt. Zusätzlich zu den oben genannten Proben wurde eine Probe kurz vor Beginn der Messung vorbereitet und als 0-Minutenwert auf eine MTP pipettiert. Die Messung wurde mit den Aptameren HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G durchgeführt. Den Hirudinplasma aller Inkubationszeiten wurden kurz vor Messstart im Verhältnis 4:1 (3+1) frisch aufgetautes Poolplasma hinzugegeben, um so der Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren in Hirudinplasma durch die langen Inkubationszeiten bis 360 Minuten bei 37°C entgegenzuwirken.

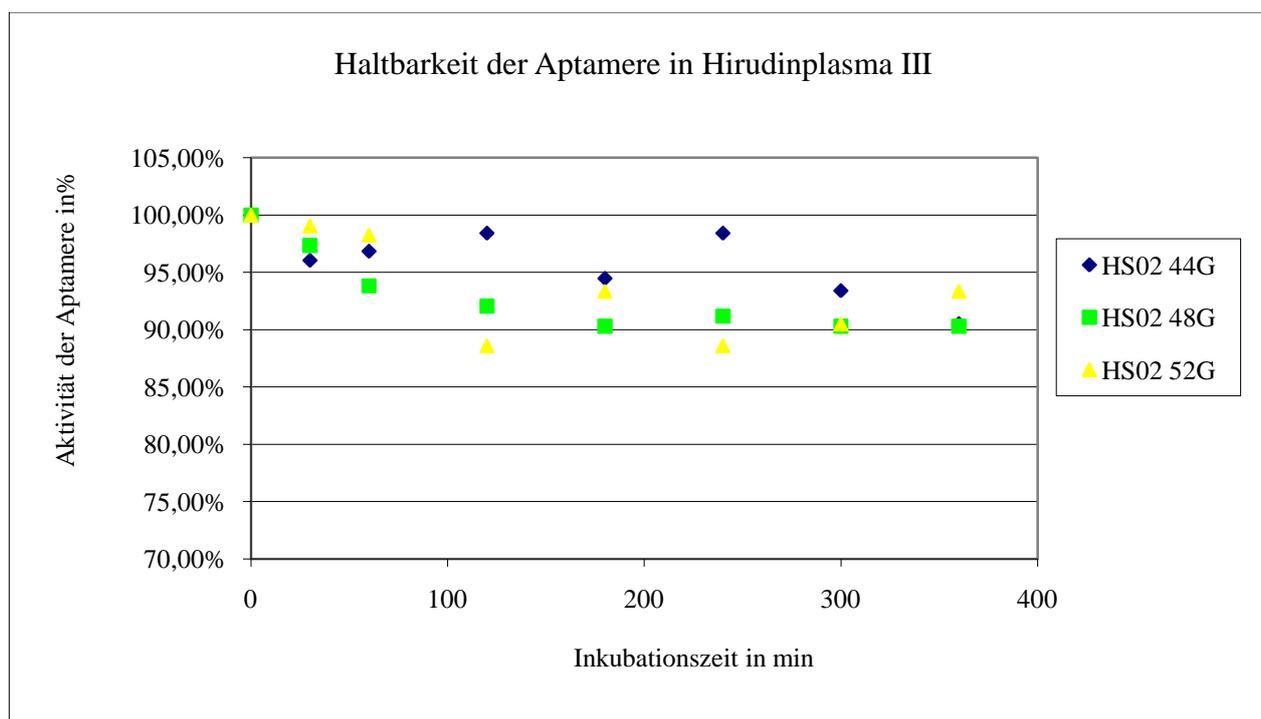


Abb.24: Einfluss von Inkubationszeiten auf die prokoagulatorische Wirkung der in der Legende angegebenen Aptamere, gemessen über das fluorogene Testsystem. Die Konzentrationen der Aptamere betragen konstant 31,6 nM.

Als Resultat besaßen die Proben Aptamerkonzentrationen von 31,6 nM. Gleichzeitig wurde in der Messung eine Verdünnungsreihe der drei Aptamere als Standardreihe mitgeführt, um den Aktivitätsverlust ablesen zu können.

Das Ergebnis zeigte, dass die Aptamere HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G über 360 Minuten eine recht gute Stabilität besaßen und ihre inhibitorischen Aktivitäten auch über diese Zeit mit einem Verlust von ca. 10% Aktivität aufrecht erhalten konnten (siehe Abb. 24). Die im Versuch verwendete Aptamerkonzentration von 32,6 nM lag zwar um einiges höher als die in Kapitel 4.1.5 im selben Versuchsablauf bestimmten Konzentrationen der IC_{50} -Werte, reichte aber dennoch nicht aus die komplette APC-Wirkung aufzuheben. Es wurde deutlich, dass die Konzentration von 32,6 nM, je nach verwendetem Aptamer, gemessen an den mitgeführten Verdünnungsreihen, verschieden ausgeprägte hemmende Wirkung besaß. Es ließen sich verschiedene Aktivitäten für den Zeitpunkt 0-Minuten berechnen. Dabei besaß das Aptamer HS02-48G die höchste Aktivität und das Aptamer HS02-44G die niedrigste.

Das Ergebnis lässt die Interpretation zu, dass auch in der Messung über das fluorogene Testsystem das Aptamer HS02-44G initial in den ersten 30 Minuten inaktiviert wurde, obwohl dieser Effekt weitaus weniger ausgeprägt war, als in den vorher beschriebenen Versuchen (siehe Abb. 23). Diese Beobachtung würde zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.3 passen, in dem gezeigt werden konnte, dass die Aktivität des Aptamers HS02-44G initial in den ersten 300 Sekunden deutlicher abfällt als bei den zu vergleichenden Aptameren. Über eine Inkubationsdauer von 30 Minuten hinaus hielt das Aptamer HS02-44G jedoch die Aktivität bei und blieb über 360 Minuten Inkubation recht stabil. Es fällt auf, dass das Aptamer HS02-44G bei Inkubationszeiten zwischen 120 Minuten und 300 Minuten sogar eine höhere Restaktivität besitzt als die Aptamere HS02-48G und 52G. Für die Aptamere HS02-48G und 52G wurde ersichtlich, dass, nach anfänglich deutlichem Abfall (bis ca. 120 Minuten Inkubation), die Aktivitäten, umso länger inkubiert wurde, bis zu einer Inkubationszeit von 360 Minuten in etwa konstant blieben (siehe Abb. 23). Ein Wirkungsabfall von ca. 10% Aktivität wurde dabei bei allen Aptameren deutlich.

4.3 Thrombingenerierung

4.3.1 Thrombomodulinwirkung in Plasma

Um die inhibitorische Wirksamkeit der Aptamere zu testen, muss als Voraussetzung APC in der Plasmaprobe enthalten sein. Über die Zugabe von Thrombomodulin (TM) wird eine Aktivierung des im Plasma enthaltenem Protein C zu aktiviertem Protein C durch Thrombin provoziert (Esmon, 2000, 2003).

In diesem Versuch musste zunächst herausgefunden werden, welche Wirksamkeit das TM auf die Thrombingenerierung hat. Das im Versuch verwendete TM wurde in Hapes-Puffer gelöst. Nun wurde eine Verdünnungsreihe des TMs mit Konzentrationen von 0 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM und 50 nM in Plasma jeweils in Doppelwerten erstellt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 20 µl PPP-Reagenz vorgelegt und 80 µl Plasma hinzupipettiert. Dazu wurden Calibratoransätze als Doppelwerte hinzugefügt, bestehend aus 20 µl Thrombin-Calibrator und 80 µl Poolplasma. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa-Lösung (siehe Schema 16) aus dem Dispenser gestartet. Es wurde das endogene Thrombinbildungspotential (ETP) bestimmt.

Schema 16

Schritt 1:	Poolplasma (80 µl) +TM	80 µl
Schritt 2:	+PPP-/ Calibrator-Reagenz	20 µl
Schritt 3:	+FluCa (1225 µl Fluobuffer, 140 µl CaCl ₂ (1 M), 35 µl fluorogenes Substrat)	20 µl

Die ETP verminderte sich mit der Zunahme der zugegebenen TM-Konzentration. Je mehr APC gebildet wurde, desto größer ist die durch APC-bedingte Inhibition der Gerinnungsfaktoren Faktor Va und VIIIa (Kalafatis et al., 1994). Wie in *Abbildung 25* gezeigt wird, stellte sich eine Konzentration des TMs von 20 µg/ml als geeignet heraus und wurde somit in den folgenden Versuchen verwendet.

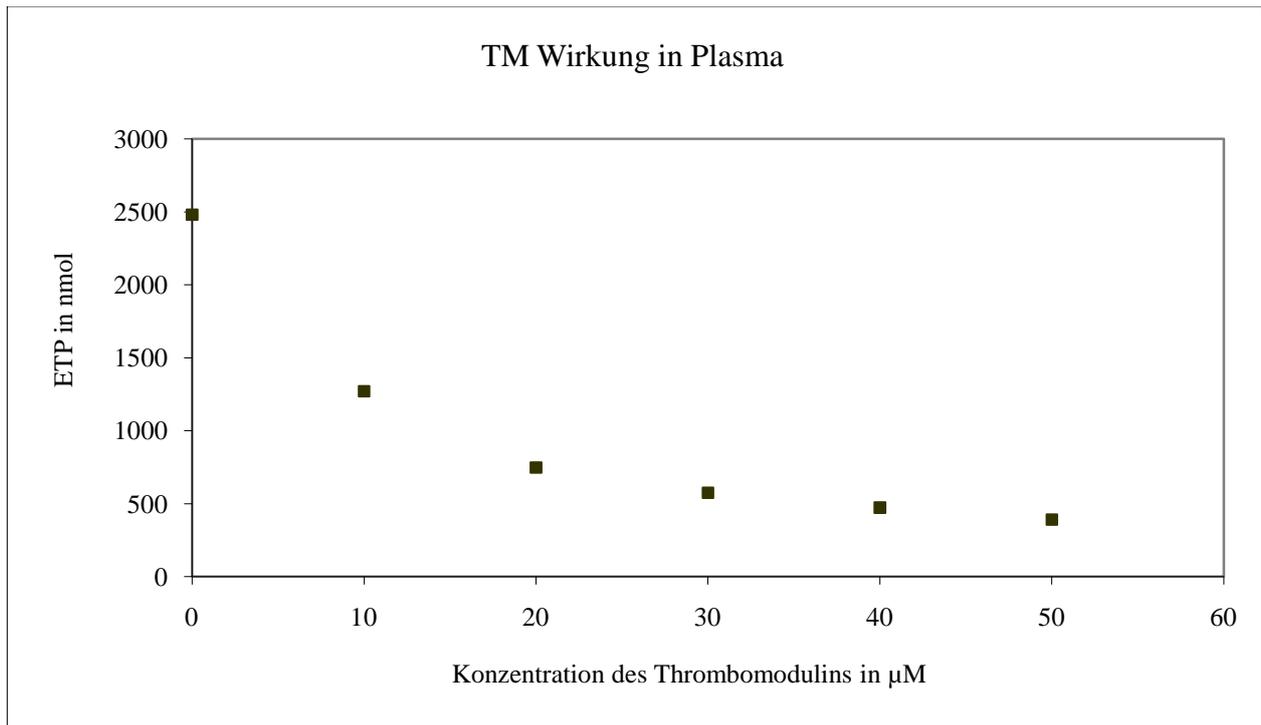


Abb.25: Abhängigkeit der Thrombomodulinkonzentration auf das endogene Thrombinbildungspotential (ETP). Durch die Zugabe von TM zum Testansatz wird Protein C zu APC durch Thrombin aktiviert und hemmt in der Folge die Faktoren Va und VIIIa.

4.3.2 Aptamerwirkung in TM-gespicktem Poolplasma

Über eine konstant zugegebene Menge an TM (20 nM) wurde eine gleichbleibende Menge an APC generiert. Dieses endogen gebildete APC sollte durch die HS02-Aptamere inhibiert werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Aptamere HS02-88 (siehe Abb. 26) und HS02-44G (siehe Abb. 27) angelegt.

Das Aptamer HS02-88 wurde in den folgenden Konzentrationen zu den Plasmaproben zugegeben: 0 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM und 500 nM. In jeder der Proben befanden sich 20 nM TM (siehe Schema 17). Zusätzlich wurde eine Probe ohne TM und ohne Aptamer als Leerwert hinzugefügt.

Der Versuchsteil mit dem Aptamer HS02-44G wurde identisch aufgebaut, es entfielen lediglich die zwei höchsten Aptamerkonzentrationen (400 nM, 500 nM). In den *Abbildungen 25* und *26* entsprechen 100% dem ETP-Wert des Leerwertes ohne TM und Aptamer.

Schema 17

Schritt 1:	Poolplasma +TM (20 nM) +Aptamer	80 µl
Schritt 2:	+PPP-/ Calibrator-Reagenz	20 µl
Schritt 3:	+FluCa (1225 µl Fluobuffer, 140 µl CaCl ₂ (1 M), 35 µl fluorogenes Substrat)	20 µl

Die Messung zeigte, dass das Aptamer in der Lage ist, endogen gebildetes APC zu inhibieren, denn es hob die Wirkung des zugegebenen TMs auf. Eine Konzentration von 200 nM des Aptamers HS02-88 reichte aus, um die Gerinnung nahezu auf den Ausgangs-ETP-Wert anzuheben und so die Gerinnungsreaktion komplett wiederherzustellen. Doch schon die Verwendung einer Konzentration des Aptamers von 100 nM hatte eine deutlich geringere inhibitorische Potenz zur Folge (siehe Abb. 26).

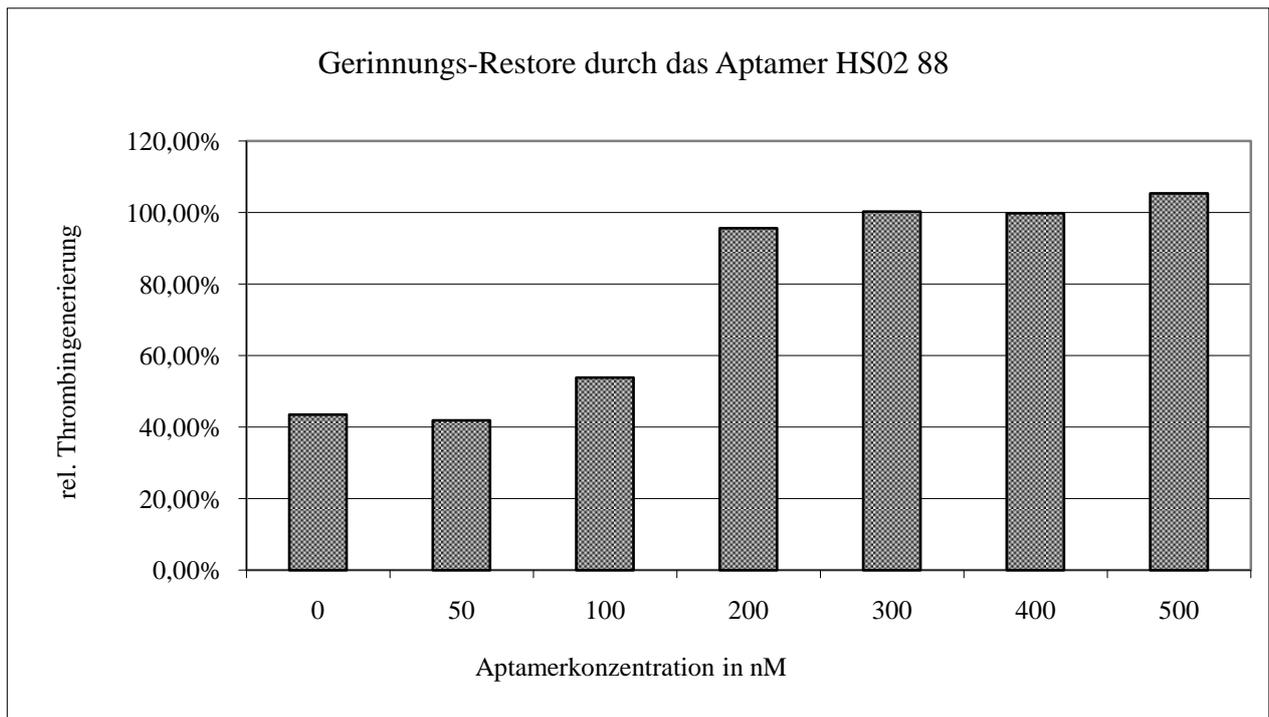


Abb.26: Einfluss der Konzentration des Aptamers HS02-88 auf endogenes APC, das mit Hilfe eine konstanten Menge an 20 nM TM generiert wurde. Die hier angegebenen Werte wurden ermittelt indem die entsprechenden ETP-Werte zu einem ETP-Wert ohne TM und ohne Aptamerzugabe in Relation gesetzt wurden.

Das Aptamer HS02-44G wies eine im Vergleich zu dem Aptamer HS02-88 schwächere aber dennoch bemerkenswerte inhibitorische Wirkung gegenüber dem endogen gebildetem APC auf und konnte bei einer Konzentration von 200 nM 80% der ETP im Vergleich zum Ausgangswert aufheben (siehe Abb. 27).

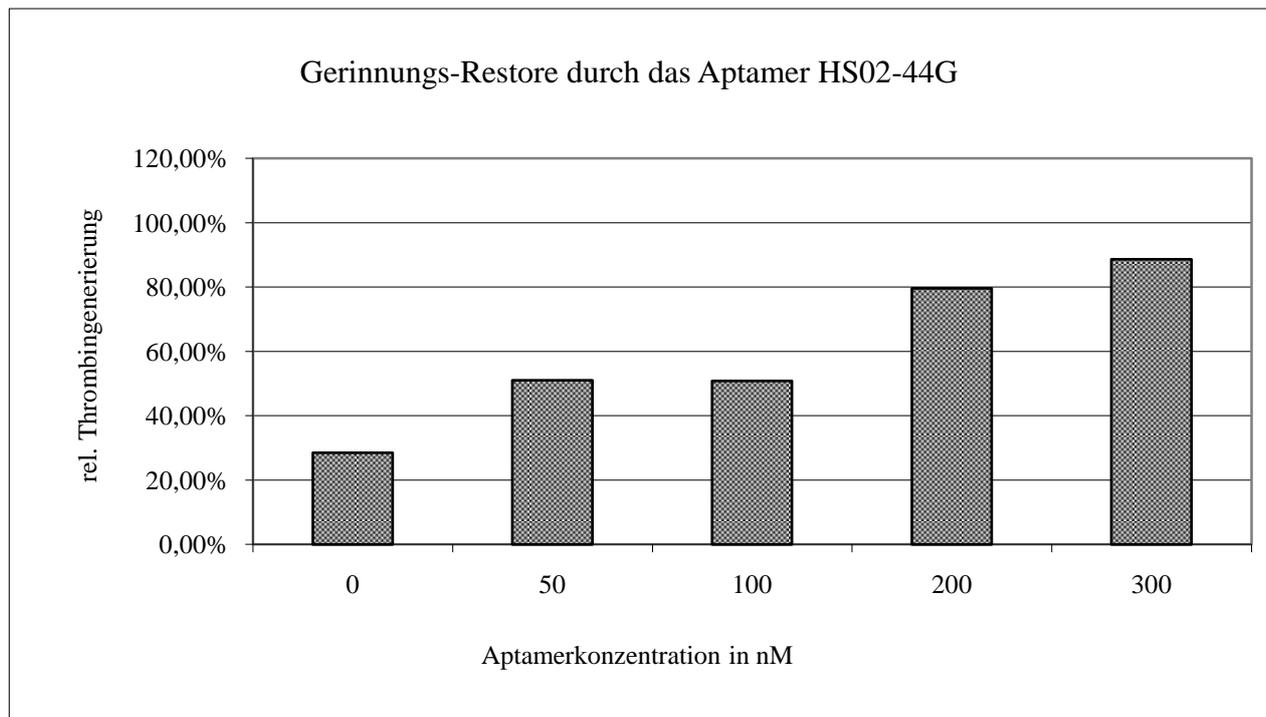


Abb.27: Einfluss der Aptamerkonzentration des Aptamers HS02-44G auf endogenes APC, das mit Hilfe einer konstanten Menge an 20 nM TM generiert wird. Die hier angegebenen Werte wurden ermittelt indem die entsprechenden ETP-Werte zu einem ETP-Wert ohne TM und ohne Aptamerzugabe in Relation gesetzt wurden.

4.3.3 Aptamerwirkung in Faktor VIII-Mangelplasma

Das Faktor VIII-Mangelplasma entspricht einem Plasma eines Patienten mit einer schweren Hämophilie A. Die Intention dieses Versuchs lag darin herauszufinden, ob die Gabe eines Aptamers bei einem Hämophilie A-Patienten die Gerinnung verbessern könnte.

Der Versuch wurde nach Schema 17 (siehe Kapitel 4.3.4) in Doppelwerten mit dem Aptamer HS02-88 durchgeführt. Die Zusammensetzung der nach Schema 17 vorgelegten Proben (80µl) variierte im Hinblick auf den Inhalt von Aptamer (200 nM) und TM (20 nM): Probe 1 enthielt Faktor VIII-Mangelplasma. In Probe 2 wurde zum Faktor VIII-Mangelplasma TM hinzugefügt.

Probe 3 bestand aus Faktor VIII-Mangelplasma und Aptamer. Die drei Inhaltsstoffe VIII-Mangelplasma, TM und Aptamer befanden sich in Probe 4.

Zusätzlich wurden als Kontrolle die Proben 1, 2 und 3 in gleicher Zusammensetzung mit Poolplasma an Stelle von Faktor VIII-Mangelplasma mitgeführt. Die Faktor VIII-Restaktivität des verwendeten Faktor VIII-Mangelplasmas betrug in einer Messung des AMAX 190 plus Koagulometer 1%.

Die Zusammensetzung des Gerinnungs-aktivierenden PPP-Reagenz war so gewählt (final 5 pM TF und 4 µM PL), dass die Faktoren VIII, IX und XI in den Gerinnungsablauf miteinbezogen wurden (Hemker et al., 2003), obwohl über den extrinsischen Aktivierungsweg gestartet wurde. Der Faktor VIII beteiligte sich am Versuchsablauf in dem er den Faktor IXa, Phospholipide und Ca^{2+} -Ionen band (*Endogene Tenase*). In der Folge wirkte er als Verstärker-Loop über die Aktivierung von Faktor X (Hemker et al., 2003). Die Differenz zwischen den ETP-Werten des Poolplasmas und denen des Faktor VIII-Mangelplasmas mit 1% Restaktivität kam dadurch zu Stande, dass diese Verstärkerschleife im Mangelplasma stark vermindert ablief. Alle übrigen Gerinnungsfaktoren sind in ihrer Konzentration sowohl im Faktor VIII-Mangelplasma als auch im Poolplasma vergleichbar.

Durch das zugegebene zellgebundene TM wird Protein C durch Thrombin mit 1000fach erhöhter Effektivität aktiviert (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). In der Folge werden Faktor Va und VIIIa unter Mithilfe eines weiteren Cofaktors, Protein S, durch APC gehemmt (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). In Faktor VIII-Mangelplasma ist der Faktor VIII in niedriger Konzentration enthalten, deshalb ist der hemmende Einfluss gerade auf den Faktor VIIIa entscheidend im Hinblick auf den Ablauf der Gerinnungsreaktion.

Die Gerinnung wurde nach Interpretation der Messung auch in Faktor VIII-Mangelplasma komplett auf das Ausgangsniveau wiederhergestellt (siehe Abb. 28). Das bedeutet, dass die ETP durch die inhibitorische Wirkung des Aptamers wieder auf den Wert der ETP in der Leerwert-Probe ohne TM-Zugabe zurückgebracht werden konnte. Folglich konnte die Wirkung des durch den Einfluss des TMs vermehrt entstandenen APCs aufgehoben werden, eine deutliche Verbesserung der Gerinnung über 100% hinaus, gemessen an der ETP des Leerwerts, war jedoch nicht möglich.

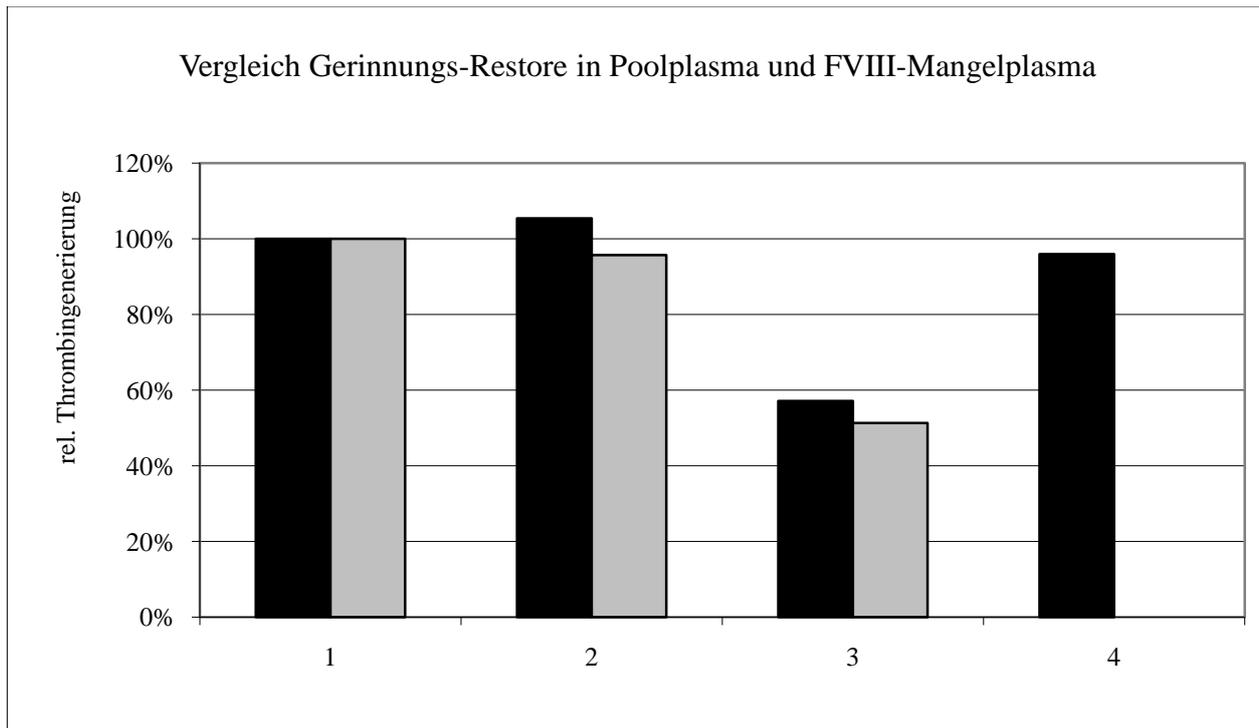


Abb.28: Die schwarzen Balken entsprechen den Werten, die in Faktor VIII-Mangelplasma gemessen wurden. Die grauen Balken stehen für die Messwerte in Poolplasma (gesundes Spenderkollektiv). An Position 1 wurde in der Thrombingerinnung weder TM noch Aptamer zugegeben. An Position 2 sind die Werte angegeben, die kein TM enthalten, denen jedoch eine Konzentration von 200 nM des Aptamers HS02-88 zugegeben wurde. Position 3 zeigt die Werte für die Probe, die zwar 20 nM TM enthält, aber kein Aptamer. Und an Position 4 wird der Einfluss von 200 nM des Aptamers HS02-88 bei gleichzeitiger Anwesenheit von 20 nM TM gezeigt.

Werden die Messergebnisse in Poolplasma mit den Ergebnissen in Faktor VIII-Mangelplasma verglichen, so ist festzustellen, dass tendenziell eine Aptamergabe in ein Faktor VIII-Mangelplasma, ohne Hinzufügen von TM, bereits einen positiven Einfluss hatte und zu einem Anstieg auf 105% der ETP führte (siehe Abb. 28). Eine Aptamergabe in ein Poolplasma ohne eine TM-Zugabe verbesserte die Gerinnung hingegen nicht. Es lässt sich daraus schließen, dass im Falle eines unverletzten Probanden das Protein C-System weitestgehend inaktiv und in diesem Fall die Aktivität des APCs als gering einzuschätzen ist.

Die Messung zeigte, dass dieselbe Konzentration von TM in Poolplasma zu einer Verminderung der ETP um die Hälfte (auf ca. 50%) führte, im Faktor VIII-Mangelplasma sank der Wert auf ca. 60% des Ausgangswertes (siehe Abb. 28). Das bedeutet, dass zwar der Gerinnungsablauf in Faktor VIII-Mangelplasma vor allem über die Hemmung des Faktors Va gebremst wurde, eine

Wiederherstellung der Gerinnung aber auch über die Inaktivierung des APCs durch Aptamere im Hinblick auf den Faktor VIIIa möglich war.

4.3.4 Aptamere im Vergleich

Die Aptamere HS02-44G, HS02-48G, HS02-52G und HS02-62 wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung im Faktor VIII-Mangelplasma mit dem Aptamer HS02-88 verglichen (siehe Abb. 29).

Mit der Fragestellung, ob die Aptamere dieselbe Aktivität gegenüber endogenem APC besitzen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt. Nach Schema 17 wurden die Aptamere in einer Konzentration von 200 nM nebeneinander auf die MTP zu 80 µl Faktor-VIII-Mangelplasma hinzupipettiert. Zusätzlich wurde ein Leerwert ohne TM und ohne Aptamere und eine Probe ohne Aptamere, aber mit 20 nM TM, angelegt. Die Gerinnungsreaktion wurde durch die automatische Zugabe von FluCa-Reagenz gestartet (siehe Schema 17).

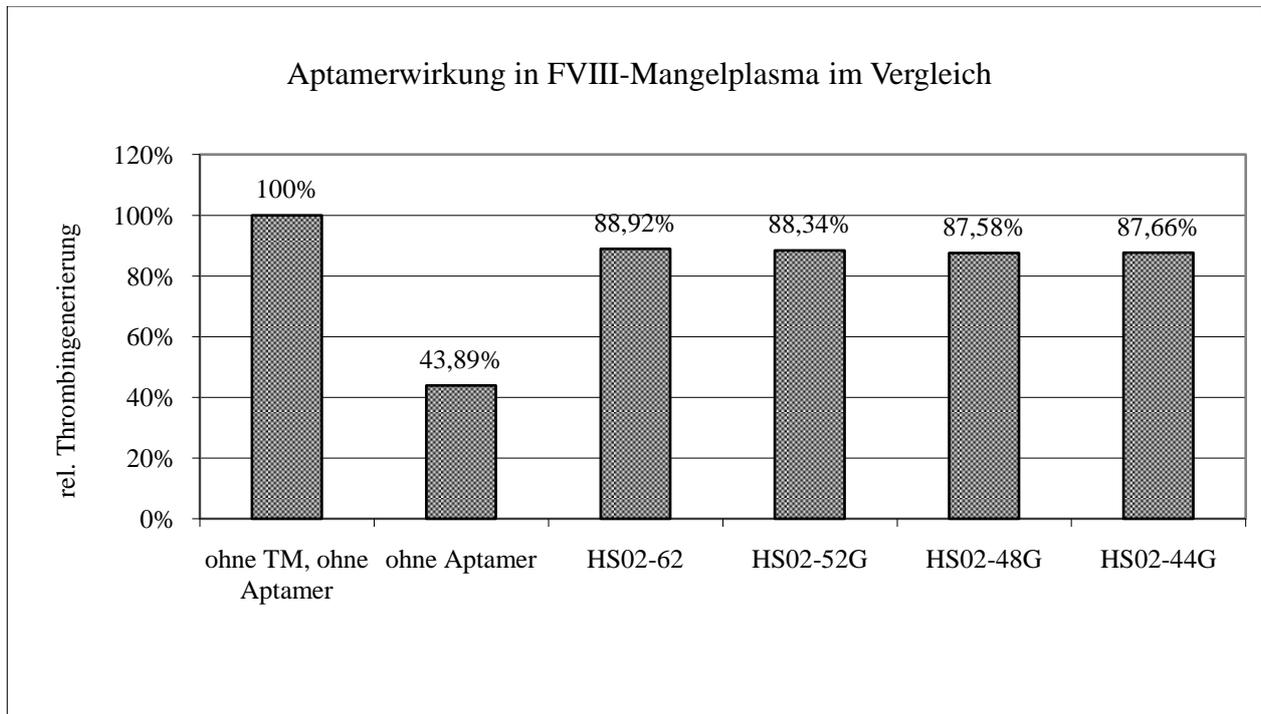


Abb.29: Hemmender Effekt der Aptamere auf das endogen entstandene APC der oben genannten Aptamere im Vergleich. Die Konzentration der Aptamere beträgt konstant 200 nM. Die ETPs der einzelnen Aptamer messungen werden mit einem Leerwert ohne Inhalt von Aptamer und TM in Relation gesetzt.

Alle Aptamere der Gruppe HS02 besaßen dieselbe inhibitorische Potenz gegenüber endogenem APC und bewirkten eine Wiederherstellung der Gerinnung auf ca. 90% des ETP-Wertes eines Leerwerts ohne Inhalt von Aptamer und TM. Bemerkenswert war, dass das Aptamer HS02-44G dieselbe inhibitorische Wirkung aufwies wie die anderen Aptamere. Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer HS02-88 in diesem Versuchsteil im Vergleich zu den anderen Aptameren der Gruppe HS02 die stärkste inhibitorische Wirkung gegenüber APC besaß.

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Diskussion

Als Zielsetzung dieser Arbeit wurde festgelegt, dass die verschieden langen HS02-Aptamersequenzen bezüglich ihres APC-inhibierenden Potentials und ihrer Stabilität in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freien Plasma charakterisiert werden sollten.

Die Versuche dieser Arbeit zeigen, dass die verwendeten Aptamere sowohl über die Gerinnungszeitmessung als auch über das fluorogene Testsystem eine hohe inhibitorische Wirkung gegenüber rekombinantem und endogenem APC besitzen und über lange Zeit im Plasma ihre Wirkung beibehalten. Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede der Aptamere innerhalb der Gruppe im Bezug auf Wirksamkeit und Haltbarkeit.

Aus den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen folgt, dass schon geringere Konzentrationen des Aptamers ausreichen, um die antikoagulatorische Wirkung des APCs zu vermindern oder aufzuheben und somit eine Blutung zu stoppen.

Doch es zeigten sich Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit der HS02-Aptamere. Vor allem die Anzahl der Nukleotide und die ΔG -Werte der einzelnen Aptamere sind hierfür verantwortlich. Die ΔG -Werte (kcal/mol) geben Informationen über Sekundärstruktur und Stabilität der Aptamere (Müller et al., 2009).

In Citratplasma unter Abwesenheit von freien Ca^{2+} -Ionen zeigte sich je kürzer das Aptamer ist, desto höher ist die Wirkpotenz. Die in diesem Versuch verwendeten Proben entsprachen dabei nicht der menschlichen Physiologie, weil kein freies Ca^{2+} enthalten war.

Da die APC-Aptamere mit derselben Bindungsstelle am aktiven Zentrum des APCs interagieren wie auch das Heparin kam es in der Messung in Heparinplasma zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle und somit zu höheren IC_{50} -Werten als in Hirudinplasma (Friedrich et al., 2001, Müller et al., 2009). Unterschiede der Wirksamkeit der APC-Aptamere kamen möglicherweise durch verschiedene ΔG -Werte der Aptamere zustande. Es fällt auf, dass für das Aptamer HS02-52G der niedrigste IC_{50} -Wert ermittelt wurde und es dabei auch den niedrigsten ΔG -Wert der Gruppe HS02 aufwies.

Vor allem in den Versuchen in Hirudinplasma wurde deutlich, dass die Aptamere eine ausgezeichnete Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich gegenüber dem rekombinant hergestellten APC besitzen und in der Lage sind, die durch APC verlängerte Gerinnungszeit wieder zu normalisieren. Unter den Gerinnungszeitmessungen in Hirudinplasma (Kapitel 4.1.3) ließen sich im Vergleich zu den Messungen in Heparinplasma und in Citratplasma die im Hinblick auf den menschlichen Organismus realistischsten IC_{50} -Werte für die Aptamere berechnen. Die Begründung liegt darin, dass die Messung in Ca^{2+} -haltigem Milieu stattfand und wurden nicht durch die oben genannte Interaktion des Heparins mit dem APC gestört. Es wurde auch in diesem Versuchsteil eine Korrelation der Wirksamkeiten der Aptamere (IC_{50} -Werte) und der ΔG -Werte der Aptamere deutlich.

Da die IC_{50} -Werte der fünf Aptamere in Hirudinvollblut parallel zu den Ergebnissen in Hirudinplasma ausfielen und vergleichbar waren, ist davon auszugehen, dass die zellulären Anteile des Blutes, die vor allem aus Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und B- und T-Lymphozyten bestehen, die Bindung der Aptamere an das APC nicht oder nur in geringem Maße beeinflussen. Sie schienen mit den Aptameren nicht in Interaktion zu treten. Dieses Ergebnis ist für eine mögliche therapeutische Applikation von Aptameren positiv zu werten, weil die Aptamere der Gruppe HS02 scheinbar ungehindert von zellulären Bestandteilen des Blutes wirken können.

Bestätigt wurden die potenten inhibitorischen Wirksamkeiten der HS02-Aptamere im niedrigen nanomolaren Bereich gegenüber APC in dem Versuchsansatz über das fluorogene Testsystem. In Hirudinplasma konnten über diesen Versuchsansatz sehr niedrige IC_{50} -Werte für die kurzen Aptamere HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G bestimmt werden. Auch im fluorogenen Testsystem wiesen die längeren Aptamere eine geringere Wirksamkeit auf. Jedoch zeigte im Vergleich zum Versuchsansatz über die Gerinnungszeitmessung auch das Minimalmotiv (HS02-44G) eine den Aptameren HS02-48G und HS02-52G vergleichbare Wirksamkeit. Die Ursachen hierfür könnten in dem Versuchsaufbau und -ablauf liegen. Eventuell wurden die Aptamere durch die im Vorhinein eintretende Bindung an das APC vor Nukleasen geschützt. Ein weiterer Grund könnte sein, dass im Gegensatz zu den anderen Versuchen in diesem Versuch die Gerinnungsreaktion und die Ca^{2+} Zugabe im selben Moment stattfanden und deshalb das Ca^{2+} in Komplexen des Gerinnungsablaufs gebunden wurde und weniger für die Bindung an DNAsen (Dougan et al., 2000) zur Verfügung stand. Außerdem wurde in diesem Versuchsansatz kein

zusätzliches Mg^{2+} verwendet, welches nach Pan und Lazarus für die Funktion der DNAsen notwendig ist (Pan und Lazarus, 1999).

Alle verwendeten Aptamere waren am 3'- und am 5'-Ende im Testlauf nicht modifiziert. Nach Meinung von Dougan et al. herrschen die 3'-Exonukleasen im Plasma vor, die vom 3'-Ende ausgehend Nukleotide von der Oligonukleotidkette abtrennen (Dougan et al., 2000).

In den Versuchen zur Messung der Stabilität der Aptamere konnte sowohl über die Gerinnungszeitmessung als auch über das fluorogene Testsystem gezeigt werden, dass alle Aptamere der Aptamergruppe HS02 außer das Aptamer HS02-44G (Minimalmotiv) und mit Einschränkung das Aptamer HS02-62 gegenüber DNAsen über Stunden weitestgehend stabil blieben. Vor allem das Minimalmotiv (HS02-44G) ist gegenüber DNAsen gefährdet, da die Abtrennung nur eines Nukleotids zu einem deutlichen Wirkungsverlust führt (Müller et al., 2009).

Die DNAsen im Plasma sind nur bei Anwesenheit von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen aktiv (Pan und Lazarus, 1999). Dies wurde in den Versuchen in Citratplasma, das freie Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen komplexiert, deutlich (Kapitel 4.2.1). Es war kein Abfall der Inaktivierung des APCs, also keine Gerinnungszeitverlängerung, zu erkennen. Das Minimalmotiv (HS02-44G) blieb stabil.

In Ca^{2+} und Mg^{2+} enthaltendem Heparin- bzw. Hirudinplasma verlor das Minimalmotiv (HS02-44G) schnell an inhibitorischer Wirkung auf das APC. Dieser Aspekt könnte auf das Wirken von DNAsen mit Hilfe von Ca^{2+} und Mg^{2+} als Cofaktoren auf das Aptamer HS02-44G zurückgeführt werden (Pan und Lazarus, 1999). Das Aptamer HS02-44G besaß jedoch sowohl in Heparinplasma als auch in Hirudinplasma nach maximaler Inkubation immer noch eine hemmende Wirkung auf das APC. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass auch das auf 43 bzw. 42 Nukleotide verkürzte Aptamer eine Bindung mit dem APC eingehen konnte, gegenüber dem HS02-44G aber eine deutlich schlechtere Affinität besaß (Salehi, 2007). Des Weiteren erscheint es möglich, dass sich die Aptamere über die Zeit an APC gebunden hatten und somit vor der Wirkung der DNAsen geschützt waren. Welcher Stabilitätsgewinn durch allein mindestens 3 Nukleotide am 3'-Ende oder am 5'-Ende zusätzlich an das Minimalmotiv zustande kommt, war in den Versuchen der Stabilität der Aptamere in Heparin- und Hirudinplasma am Beispiel des Aptamers HS02-48G zu sehen.

Die Ergebnisse der Gerinnungszeiten der Aptamere HS02-62 und -44G in Hirudinplasma wichen von den Werten der Aptamere HS02-48G, -52G und -88 sowohl nach kurzen als auch nach

längeren Inkubationszeiten ab und schienen eine schlechtere Wirksamkeit hinsichtlich der Inaktivierung des APCs auf die Gerinnung zu haben. Erklärt werden könnte die abgeschwächte Wirkpotenz dadurch, dass sowohl das Aptamer HS02-44G, als auch HS02-62 einen höheren ΔG -Wert und somit eine schlechtere Stabilität besitzen als die übrigen HS02-Aptamere (Müller et al., 2009). Durch diesen Stabilitätsunterschied wurde möglicherweise mit Zunahme der Inkubationsdauer die Wirksamkeit der Aptamere HS02-44G und 62G abgeschwächt.

Die Ergebnisse aus dem fluorogenen Testsystem für die Aptamere HS02-44G, HS02-48G und HS02-52G sind im Hinblick auf die langen Inkubationszeiten am aussagekräftigsten, da in diesem Versuchsteil der Effekt der Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren nach längerer Inkubation bei 37°C minimiert wurde.

Das Ergebnis zeigte, dass die Bildung von Thrombin lediglich geringfügig fällt, was bedeutet, dass die Aptamere nach 360 Minuten noch eine deutliche Wirkung gegenüber dem APC entfalten konnten. DNAsen konnten allenfalls einen kleinen Einfluss gehabt haben, obwohl Ca^{2+} und Mg^{2+} in den Proben enthalten waren.

Es bleibt abzuwarten, wie haltbar die Aptamere in der Zirkulation im Organismus sind (White et al., 2000). Um die Aptamere vor Nukleasen zu schützen können diese modifiziert werden, ohne dass die Aktivität negativ beeinflusst wird. Das 3'-Ende des Aptamers kann so beispielsweise durch das Anhängen von einer Kappe gegen das Wirken von Exonukleasen geschützt werden (Proske et al., 2005).

Im menschlichen Kreislauf ist mit einer nur einige Minuten andauernde Eliminierung der niedermolekularen Aptamere über die Niere und Leber zu rechnen (White et al., 2000). Doch kann durch Anheftung eines hochmolekularen Moleküls z.B. PEG (Polyethylenglykol) (ca.40 kD) am 3'-oder 5'-Ende des Aptamers die Bioverfügbarkeit des Aptamers gesteigert werden. Die Halbwertszeit konnte dadurch im Falle des in der Augenheilkunde eingesetzten Anti-VEGF-Aptamers Pegaptanib® auf 10+/- 4 Tage verlängert werden (Mayer und Famulok, 2007). Zur Steigerung der Bioverfügbarkeit sollte bei dem verwendeten HS02-Aptamer ein PEG-Linker an das 3'- oder 5'-Ende angehängt werden.

Die hohe Stabilität ist ein wesentlicher Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten DNA-APC-Aptamere gegenüber den im Jahr 1998 beschriebenen RNA-APC-Aptameren von Gal et al. Die RNA-Aptamere sind labiler und besitzen eine kürzere Halbwertszeit in der Plasmamatrix aufgrund einer höheren Aktivität von RNAsen (Reddi und Holland, 1976). Die RNA-Aptamere liegen wie die verwendeten DNA-Aptamere in nicht modifizierter Form vor (Brody und Gold, 2000). Ein

weiterer Nachteil der von Gal et al. beschriebenen 167, bzw. 99 Nukleotide langen Aptamere ist die deutlich geringere Affinität zu APC verglichen mit den hier beschriebenen DNA-Aptameren. Die K_D -Werte der beschriebenen RNA-Aptamere liegen im Bereich zwischen 83 nM und 137 nM und sind damit deutlich höher, als die für die Aptamergruppe HS02 bestimmten K_D -Werte, die zwischen 0,47 nM (HS02-88) und 1,06 nM (HS02-62) angegeben werden (Müller et al., 2009). Die in dieser Arbeit bestimmten IC_{50} -Werte in Plasma liegen je nach Versuchsaufbau und -ablauf bei ca. 1-10 nM (siehe Kapitel 4.1). DNA-Aptamere sind generell kostengünstiger herzustellen als RNA-Aptamere (Jayasena, 1999). Hinzu kommt, dass sich auch die Anzahl der Nukleotide der DNA- und RNA-Aptamere unterscheiden. Die Folge ist, dass eine einfachere und somit kostengünstigere Produktion der hier beschriebenen DNA-Aptamere möglich ist. Für den klinischen Einsatz ist wichtig, ob das eingesetzte Medikament mit Protein C kreuzreagiert, also spezifisch ausschließlich an APC bindet. Dieser Aspekt konnte für das RNA-Aptamer nicht dargestellt werden (Gal et al., 1998). Im Gegensatz dazu besitzt die Aptamergruppe HS02 eine hohe Affinität zu APC und zeigt dabei eine Selektivität gegenüber Protein C (Müller et al., 2009).

Die sehr potente inhibitorische Wirkung der Aptamere im Bezug auf *endogenes APC* konnte in den Versuchen über die Thrombingenerierung nachgewiesen werden. Sowohl in Poolplasma als auch in Faktor VIII-Mangelplasma waren die Aptamere in niedriger Konzentration wirksam. Es zeigten sich wie in den vorhergehenden Versuchen Unterschiede in der inhibitorischen Wirkpotenz gegenüber APC.

Das Aptamer HS02-44G besaß in Poolplasma im Vergleich zu dem Aptamer HS02-88 bei gleichen Konzentrationen eine schlechtere Wirkung gegenüber endogenem APC. Dies könnte mit dem Einfluss von DNAsen zusammenhängen, die einen stärkeren Wirkungsverlust des Aptamers HS02-44G hervorrufen könnten. Nach dieser Annahme ist davon auszugehen, dass ein initialer Wirkungsverlust des Aptamers HS02-44G eingetreten war. Eine mögliche Begründung könnten die nach Müller et al. ermittelten K_D -Werte der Aptamere HS02-88 (K_D -Wert von 0,47) und Aptamer HS02-44G (K_D -Wert von 0,76) geben (Müller et al., 2009). Auch der sich in einer niedrigeren Stabilität äußernde höhere ΔG -Wert des Aptamers HS02-44G (Müller et al., 2009) könnte verglichen zu dem Aptamer HS02-88 in diesem Versuchsteil zu einer verminderten inhibitorischen Wirksamkeit geführt haben. Eine komplette Aufhebung der mit Hilfe des Thrombomodulin induzierten APC-Wirkung wurde durch hohe Konzentrationen sowohl des Aptamers HS02-88 als auch des HS02-44G erreicht.

In Faktor VIII-Mangelplasma, das dem Plasma eines Hämophilie-A-Patienten entspricht, wurden die Aptamere hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkpotenz gegenüber endogenem APC verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Aptamergruppe HS02 gegenüber endogen gebildetem APC ein etwas anderes Wirkungsprofil aufwies als gegenüber exogen zugegebenem rekombinantem APC (XIGRIS®). Das Aptamer HS02-88 stellte sich bei einer Konzentration von 200 nM als das wirkungsvollste Aptamer der Gruppe HS02 heraus. Eine mögliche Begründung ist, dass das Aptamer den niedrigsten K_D -Wert und damit die höchste Affinität der ausgetesteten Aptamere gegenüber körpereigenem APC besaß (Müller et al., 2009). Das Aptamer HS02-44G entfaltete eine den anderen Aptameren vergleichbare Wirkung, obwohl ein Wirkungsdefizit aufgrund der Anwesenheit von DNAsen in einem Ca^{2+} enthaltenden System und des hohen ΔG -Wertes (Müller et al., 2009) zu erwarten gewesen wären. Jedoch scheint die Konzentration von 200 nM des Aptamers HS02-44G so hoch gewählt, dass ein nur geringer Abfall der Konzentration keinen Einfluss auf die Thrombingenerierung hatte. Die Thrombinentstehung in den Versuchen wurde über die Messung der ETP-Werte deutlich.

Sowohl in Faktor VIII-Mangelplasma wie auch in Poolplasma variierten die ETP-Werte der Probe mit enthaltenden Aptameren ohne TM mit den entsprechenden ETP-Werten der Leerwerte, ohne Inhalt von Aptamer und TM, nur geringfügig. Folglich lässt sich deuten, dass das Protein C-System in der Probe physiologisch nicht aktiv und somit die Aktivität des APCs gering war, da ein zusätzlicher ETP-Anstieg über die Aptamerzugabe nicht möglich war. Es lässt sich schließen, dass das Aptamer bei einem gesunden Patienten ohne Verletzung keinen deutlichen hemmenden Einfluss besitzen kann. Wird allerdings im Verletzungsfall als Resultat der sekundären Hämostase Prothrombin zu Thrombin aktiviert (Di Cera, 2003), wird unter Mithilfe von TM lokal die Entstehung von APC gefördert. Nun besitzt das Aptamer eine potente inaktivierende Wirkung auf APC und unterstützt dadurch die Gerinnungsreaktion.

In weiteren Experimenten, z.B. im Tiermodell, ist es nicht nötig alle Aptamere der Gruppe HS02, mit derselben Bindungsdomäne (siehe Kapitel 1.2.4.4), weiter zu verwenden. Als geeignetes Aptamer mit den größten Vorteilen hinsichtlich der inhibitorischen Eigenschaften gegenüber APC und der Stabilität kristallisiert sich das Aptamer HS02-52G heraus, da es in nahezu allen Versuchen die niedrigsten mittleren inhibitorischen Konzentrationen aufwies (IC_{50}) und folglich aus der Aptamergruppe HS02, das Aptamer mit der höchsten inhibitorischen Aktivität gegenüber APC zu sein scheint. Zusätzlich ist das Aptamer HS02-52G mit dem Aptamer HS02-48 das

stabilste Aptamer mit dem niedrigsten ΔG -Wert (siehe Tabelle 1, Kapitel 1.2.4.4, Müller et al., 2009).

Der optimale Wirkspiegel des rekombinanten als Medikament hergestellten APC, bei dem eine optimale Wirksamkeit im menschlichen Organismus zu erwarten ist bei geringen Nebenwirkungen, beträgt ca. 50 ng/ml (Macias et al., 2002). Eine genaue Messbarkeit des Plasmaspiegels ist aber aufgrund der ungenauen Messmethoden bisher nicht möglich. Durch die vorgestellten Aptamere könnte es möglich sein den APC-Spiegel im Blut zu messen und so eine Therapie mit XIGRIS® zu überwachen (Müller et al., 2009). Bisher beschriebene Methoden waren zur quantitativen Bestimmung der APC-Konzentration nicht genügend sensitiv bzw. wegen der Methodendurchführung nicht geeignet für die klinische Diagnostik (Liaw et al., 2003). Durch die Aptamergruppe HS02 könnte es möglich sein, ein Testsystem zu etablieren, das den APC-Spiegel im Plasma messen kann.

Zur Beantwortung der Fragestellung ist es wichtig, dass in Tierexperimenten und klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass Hämophilie A- und B-Patienten von einer gleichzeitig bestehenden Faktor-V-Leiden-Mutation profitieren (Nichols et al., 1996; Vianello et al., 2001; Shetty et al., 2007). Bei Ihnen lassen sich Blutungskomplikationen seltener feststellen und die Blutungsneigung ist vermindert. Grundlage der Faktor-V-Leiden-Mutation ist in ca. 98% der Fälle ein Austausch im Faktor V-Protein an Aminosäureposition 506 (Nicolaes und Dahlbäck, 2002). Dieser Austausch hat zur Folge, dass Faktor V durch APC 10mal langsamer gespalten werden kann (Witt und Dörner, 2003). Die Inaktivierung des Faktors Va ist unzureichend, was sich nach Vos (2006) prothrombotisch auswirkt.

Sowohl durch die Faktor-V-Leiden-Mutation als auch durch die Hemmung des APCs durch einen Inhibitor kann der aktivierte Faktor V nicht ausreichend gehemmt werden und die Halbwertszeit des Prothrombinasekomplex verlängert sich (Butenas et al., 2006). Deshalb wird seit 1998 von Butenas et al. eine APC-Inhibition zur unterstützenden Behandlung der Hämophilie eine medikamentöse Inaktivierung des APCs propagiert. Des Weiteren ist es hierdurch möglich, dass die Aktivität des aktivierten Faktors VIII gesteigert und die Inhibition des Faktors VIIIa durch einen APC-Inhibitor gehemmt wird. Die Halbwertszeit des Faktors VIIIa könnte auf diese Weise gesteigert und ein Mangel an Faktor VIII zum Teil kompensiert werden. Deshalb wurden in einigen in vitro Studien wirkungsvolle Stoffe zur APC-Inhibition entwickelt und getestet. Im

Jahr 2006 wurde von De Nanteuil et al. ein Derivat des Proteaseinhibitors Benzamidin mit APC-inhibitorischer Wirkung beschrieben. Dieser synthetische Inhibitor ist zwar potent in der Bindung und Inhibierung des APCs, besitzt aber mit einem maximalen IC_{50} -Wert von 100 nM eine deutlich schlechtere Affinität als die in dieser Arbeit beschriebenen APC-Aptamere, die je nach Versuchsaufbau und -ablauf bei ca. 1-8 nM für das Aptamer HS02-52G (siehe Kapitel 4.1) gemessen wurden. Auch die beschriebenen APC-Inhibitoren von Butenas et al. (2006) liegen lediglich im Bereich eines K_i -Werts von 1-2 μ M. Beide Inhibitoren sind nicht vollständig selektiv, sondern weisen eine Kreuzreaktivität zu Thrombin auf (De Nanteuil et al., 2006; Butenas et al., 2006). Die verminderte Selektivität und eine eventuelle Toxizität schränkt eine mögliche Verwendung der Substanzen in vivo ein.

Kapitel 4.3 zeigt, dass alle Aptamere der Gruppe HS02 zur potenten Inhibition auch des endogen gebildeten APCs aus Thrombin mit einer hohen Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich geeignet sind. Weitere Vorteile der Aptamere sind eine chemische Stabilität und eine niedrige Immunogenizität (White et al., 2000, Wlotzka et al., 2002). Hierdurch bietet sich eine Verwendung der Aptamere als Medikament an. Zusätzlich bindet das Aptamer hoch- selektiv ausschließlich an APC und nicht an Thrombin. Die antiapoptotischen Eigenschaften und die zytoprotektive Funktion bleiben dabei erhalten (Müller et al., 2009).

Eine verminderte Wirksamkeit des Faktors VIIIa spontan oder im Verletzungsfall bei Patienten mit einer Hämophilie A kann lokal schlimme Blutungen nach sich ziehen. Vor allem in Gelenke und Muskeln blutet es ein und nicht selten kann es bei hohem Schweregrad zu lebensgefährlichen Blutungen kommen (Pötzsch und Madlener, 2002). Durch die prophylaktische Unterdrückung des APC-Systems, welches auch bei Hämophiliepatienten physiologisch im Gleichgewicht steht, könnten somit gezielt Blutungskomplikationen vermieden werden. Auch im Falle einer Blutung wäre es denkbar, dass durch die Hemmung des APCs durch die Aptamere die Blutungszeit verkürzt werden könnte.

Doch die Unterdrückung des APCs durch die Aptamere könnte auch Nebenwirkungen haben. Zu erwarten ist, vergleichbar mit einem angeborenen Mangel an Protein C, dass die Gefahr des Ereignisses einer Venenthrombose deutlich erhöht wird (Mann und Kalafatis, 2003). Patienten mit einem unterdrückten Protein C-System im Blut sind gefährdet eine Purpura fulminans zu entwickeln, die sich in nach Dahlbäck und Villoutreix (2005) in einer ausgeprägten Thrombosierung der Mikrozirkulation äußert.

Das Protein C-System steht physiologisch im Gleichgewicht. Aktiviert wird Protein C durch Thrombin mit Unterstützung des Thrombomodulins (Dahlbäck und Villoutreix, 2005). Den wichtigsten hemmenden Einfluss auf das Protein C-System besitzt nach Geiger (2007) der Protein C Inhibitor (PCI). Die verwendeten Aptamere verändern die Struktur des APCs und beschleunigen dadurch die Inhibitionsrate von APC durch PCI (Müller et al., 2009). Zusätzlich zum direkten hemmenden Einfluss der Aptamere auf APC wird also APC durch PCI vermehrt inaktiviert. Hierdurch wird das Gleichgewicht im Sinne einer verstärkt ablaufenden Koagulation verschoben. Als Folge ist wiederum mit einer erhöhten Gefahr einer Venenthrombose zu rechnen.

Für das Aptamer HS02-52G konnte eine niedrige mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) gegenüber rekombinatem APC (XIGRIS®) ermittelt werden. Zusätzlich konnte eine lange Haltbarkeit und damit eine effektive Wirksamkeit gezeigt werden. Diese Eigenschaften sind vorteilhaft für eine mögliche therapeutische Verwendung der Aptamere als Antidot bei einer Überdosierung des in der schweren Sepsis eingesetzten rekombinanten APCs (XIGRIS®). XIGRIS® führt bei 2% der behandelten Patienten als Nebenwirkung zu schweren Blutungskomplikationen und ist daher nur eingeschränkt einsetzbar (Levi, 2008). Durch das Aptamer HS02-52G als bisher einzig beschriebenes Antidot, was spezifisch an APC bindet und dessen Wirkung inhibiert, könnte der Einsatz von XIGRIS® sicherer werden. Dabei verliert das APC nur seine antikoagulatorische Wirkung, behält aber die für die Sepsis maßgebliche antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkung bei (Müller et al., 2009).

5.2 Ausblick

In einem Tierexperiment sollte die Relation zwischen Aptamerkonzentration und der Wirkung des Aptamers im Organismus untersucht werden. Die Wirksamkeit und der Nutzen eines APC-Inhibitors bei Hämophile A und B wären anhand eines geeigneten knockout Tiermodells zu prüfen. Wichtig ist dabei herauszufinden bei welcher Konzentration des Aptamers der größte Nutzen zu erwarten ist und ob eventuell Nebenwirkungen auftreten.

Eine interessante Fragestellung ist, ob sich die Aptamere in bestimmten Organen anlagern. Dies kann mit Hilfe einer radioaktiven Markierung des Aptamers herausgefunden werden, z.B. durch die Anheftung von ^{123}I oder ^{125}I (Dougan et al., 2000). Mit Hilfe dieser Iod-Moleküle kann ein Verteilungsprofil des Aptamers im Organismus im Zeitverlauf erstellt werden. Auch die

Ausscheidung über die Niere könnte quantifiziert werden. Je nach renaler Clearance könnte man das Aptamer mit den in Kapitel 5.4 beschriebenen Möglichkeiten modifizieren.

In einer weiteren Versuchsreihe (Tiermodell) kann APC als Medikament XIGRIS® in bestimmten Konzentrationen vorimpliziert und mit Hilfe des Aptamers die Wirkung im Organismus wieder aufgehoben werden. Dabei ist darauf zu achten, ob und welche Nebenwirkung durch die Applikation des Aptamers entstehen. Aufgrund einer effektiven Hemmung des Protein C-Systems könnte mit einer Neigung zur Ausbildung einer Venenthrombose gerechnet werden (Mann und Kalafatis, 2003).

Um die Sicherheit in der Verwendung des Aptamers HS02-52G zu erhöhen, könnten Antisense-Moleküle hergestellt werden, die als komplementäre Basenpaarung in der Lage sind die Struktur und Funktion des Aptamers zu blockieren (Rusconi et al., 2004). Gerade bei medikamentöser Manipulation der Gerinnung ist es enorm wichtig schnell sowohl prokoagulatorisch als auch antikoagulatorisch einzugreifen. Würde also als Nebenwirkung einer Aptamerapplikation von HS02-52G die Gefahr einer Thrombosebildung entstehen, so könnte diese über das Antisense-Molekül vermieden werden.

6 Zusammenfassung

Das Protein-C-System reguliert die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems durch proteolytische Inaktivierung der aktivierten Gerinnungsfaktoren V und VIII. Das als Zymogen im Blut zirkulierende Protein C, als Schlüsselenzym des Systems, wird an der Oberfläche von Endothelzellen durch einen proteolytischen Komplex bestehend aus Thrombin und Thrombomodulin aktiviert. Durch diesen Prozess kann die Blutgerinnung auf defekte Gefäßwandbereiche beschränkt werden. Desweiteren besitzt aktiviertes Protein C (APC) antiapoptotische und entzündungshemmende Eigenschaften, weshalb eine rekombinant hergestellte Form des APCs (XIGRIS®) als Medikament in der Behandlung der schweren Sepsis eingesetzt wird.

Blutungskomplikationen stellen eine relevante Nebenwirkung der APC-Therapie dar, die aufgrund des Fehlens eines APC-Antidots bisher nur durch allgemeine hämostatische Maßnahmen behandelt werden können. Ein mögliches APC-Antidot stellen APC-spezifische DNA-Aptamere dar.

In dieser Arbeit sollte die Affinität zu APC von fünf Aptameren in einer Länge zwischen 44 und 88 Nukleotiden der Aptamergruppe HS02 quantifiziert und verglichen werden. Die Stabilität der verschieden langen Aptamere sollte in humanem Plasma und Vollblut überprüft werden. Weiterhin sollte in verschiedenen in-vitro-Untersuchungen getestet werden, ob die APC-inhibitorische Wirkung der HS02-Aptamere zur Antagonisation von rekombinantem APC bei möglichen Blutungskomplikationen eingesetzt werden kann und ob die Aptamer-vermittelte Hemmung der APC-Wirkung einen möglichen supportiven Ansatz in der Behandlung von Patienten mit Hämophilie A und B darstellt.

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aptamere APC in humanem Plasma und in Vollblut mit hoher Effektivität im niedrigen nanomolaren Bereich inhibieren. Es stellte sich heraus, dass die Affinitäten der einzelnen Aptamere gegenüber dem Zielmolekül in den getesteten Plasmen differierten. In Ca^{2+} -haltigem Plasma wiesen die Aptamere HS02-48G und HS02-52G die höchste Affinität auf. Die Affinität des Aptamers HS02-88 war dagegen eingeschränkt. Im weiteren Versuchsablauf zeigte sich, dass das kürzeste Aptamer, das auf das Minimalmotiv HS02-44G beschränkt war, am instabilsten war und initial in Ca^{2+} -haltigem Plasma deutlich an inhibitorischer Wirkung verlor. Im Gegensatz hierzu stellten sich vor allem

die Aptamere HS02-52G und HS02-48G als die stabilsten Aptamere der Gruppe HS02 heraus und blieben auch über einen Inkubationszeitraum von 6 Stunden weitestgehend stabil.

Über die generierten Oligonukleotide ist es im in-vitro-System möglich die antikoagulatorische Wirkung von rAPC effektiv aufzuheben. Dies legt eine Verwendung der HS02-Aptamere als rAPC-Antidot nahe.

Auch in der Behandlung von Hämophilie-A-Patienten könnte der Einsatz von HS02-Aptameren hilfreich sein, da endogen gebildetes APC inaktiviert wird und somit die geringe Restkonzentration von funktionell aktivem FVIII vor proteolytischer Inaktivierung geschützt wird. Diese Hypothese konnte in APC-Generierungsexperimenten mit FVIII-Mangelplasma belegt werden. Allerdings muss in der Nutzen-Risiko-Abwägung eines solchen Therapieansatzes das prothrombotische Potenzial einer APC-inhibierenden Therapie berücksichtigt werden.

7 Literaturverzeichnis

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

Aznar J Espana F, Estelles A, Royo M. Heparin simulation of the inhibition of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor- influence of the molecular weight of heparin and ionic strength. *Thromb Haemost* 1996; 76: 983-988

Beaudry AA, Joyce GF. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* 1992; 257: 635-641

Bernhard GR, Macias WL, Joyce DE, Willams MD, Bailey J, Vincent JL. Safety assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. *Critical Care* 2003; 7: 155- 163

Bernhard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. For the Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for treatment of patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709

Bishop P, Lawson J. Recombinant Biologics for Treatment for Disorders. *Nat Rev Drug Discovery* 2004; 3: 684-694

Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol* 2004; 40: 1333-1346

Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992; 355: 564-566

- Brody EN, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol* 2000; 74: 5-13
- Brody EN, Willis MC, Smith JD, Jayasena S, Zichi D, Gold L. The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics. *Mol Diagn* 1999; 4: 381-388
- Burgstaller P, Girod A, Blind M. Aptamers as tools for target prioritization and lead identification. *Drug Discov Today* 2002; 7: 1221-1228
- Burgstaller P, Kochoyan M, Famulok M. Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine- specific RNA aptamers identify base positions required for binding. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4769-4776
- Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C, Keefe AD. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem Biol* 2005; 12: 25-33
- Butenas S, Mann K. Peptidomimetics Containing 6-Peptidylamino-1-Naphtalenesulfonamide Moieties. World Patent WO 98/22125, 1998
- Butenas S, Orfeo T, Kalafatis M, Mann G. Peptidomimetics inhibitors for activated protein C: implications for hemophilia management. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2411-2416
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. May 2005; 129: 307-21
- Chu TC, Marks JW. 3rd, Lavery LA, Faulkner S, Rosenblum MG, Ellington AD, Levy M. Aptamer: Toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66: 5989-5992
- Coller BS. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Ann Rev Med* 1992; 43: 171-180

Conrad R, Ellington AD. Detection immobilized protein kinase C isoenzymes with RNA aptamers. *Anal Biochem* 1996; 242: 261-265

Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 2005; 257: 209-223

Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition of the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1525-1534

Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway. *Vasc Biol* 2005; 25: 1311-1320

Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Letters* 579 2005, 3310-3316, Elsevier © 2005 Federation of European Biochemical Societies

De Nanteuil G, Gloanec P, Béguin S, Giesen PLA, Hemker HC, Menecier P, Rupin A, Verbeuren TJ. Low Molecular Weight Activated Protein C Inhibitors as a Potential Treatment for Hemophilic Disorders. *J Med Chem* 2006; 49: 5047-5050

Di Cera E. Thrombin interactions. *Chest* 2003; 124: 11S-17S

Dougan H, Lyster DM, Vo CV, Stafford A, Weitz JI, Hobbs JB. Extending lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol* 2000; 27: 289-297

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

Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation system. *Trends immunol* 2004; 25: 536-542

Esmon CT. The protein C Pathway. *Chest* 2003; 124: 11S-17S

Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 2000; 83: 639-643

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

Famulok M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9: 324-329

Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem* 1991; 266: 20139-20145

Ferreira CS, Matthews CS, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumor marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol* 2006; 27: 289-301

Friedrich U, Blom AM, Dahlbäck B, Villoutreix BO. Structural and energetic characteristics of the heparin-binding site in antithrombotic protein C. *J Biol Chem* 2001; 276: 24122-24128

Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53: 505-518

Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA Aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1029-1036

Geiger M. Protein C inhibitor, a serpin with functions in- and outside vascular biology. *Thromb Haemost* 2007; 97: 343-347

George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531-1539

Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 763-797

Gopinath SC, Misono TS, Kawasaki K, Mizuno T, Imai M, Odagiri T, Kumar PK. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinine-mediated membrane fusion. *J Gen Virol* 2006; 87: 479-487

Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 73-80

Grinnell BW, Joyce D. Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29: S53-S60 Review

Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB. Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology* 1994; 4: 221-225

Groner B, Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 170-182

Haeberli A. Human protein data. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1992

Heckel A, Buff MC, Raddatz MS, Müller J, Pötzsch B, Mayer G. An anticoagulant with light-triggered antidote activity. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006; 45: 6748-6750

Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH. Identification of divalent metal ion dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and α_2 -antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Biol Chem* 1991; 266: 17606-17612

Hermans JM, Stone SR. Interaction of activated protein C with serpins. *Biochem J* 1993; 295: 239-245

Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 4-15

Herold G. Hämorrhagische Diathesen, Einführung. In: Herold - Innere Medizin: 2007, S. 114-116

Holly JL. Cardiometabolic Risk Syndrome Part V: Fibrinolytic Dysfunction. *Your Life Your Health, The Examiner* January 11th, 2007

Iwazaki T, Li X, Harada K. Evolvability of the mode of peptide binding by an RNA. *RNA* 2005; 11: 1364-1373

James W. Aptamers in the virologists' toolkit. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 351-364

Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999; 45: 1628-1650

Kaiser B. Pharmakologische Eigenschaften von Tissue Factor- und Faktor Xa-Inhibitoren. *Nova Acta Leopoldina NF* 80 1999; 311: 147-162

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

Kawabata S, Miura T, Morita T, Kato H, Fujikawa K, Iwanaga S, Takada K, Kimura T, Sakakibara S. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem* 1988; 172: 17-25.

Kehrel BE. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* 2003; 23: 149-158

Klinge J, Ananyeva NM, Hauser CAE, Saenko EL. Hemophilia A. From Basic Science to Clinical Practice. *Semin Thromb Hemostasis* 2002; 28: 309-321

Kohn DB, Bauer G, Rice CR, Rothschild JC, Carbonaro DA, Valdez P, Hao Q, Zhou C, Bahner I, Kearns K, Brody K, Fox S, Haden E, Wilson K, Salata C, Dolan C, Wetter C, Aguilar-Cordova E, Church J. A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 1999; 94: 368-371

Levi, M. Activated protein C in sepsis: a critical review. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 481-486

Liaw PC, Ferrell G, Esmon CT. A monoclonal antibody against activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 662-670

Liu J, Lu Y. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2006; 45: 90-94

Lüllmann H, Mohr K. *Pharmakologie und Toxikologie: Beeinflussung der Blutgerinnung.* Stuttgart-New-York: Thieme 1999, 173-183

Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 2002; 62: 4029-4033

Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy and development of inhibitors. Kongenat Previously Untreated Patient Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328: 453-459

Macias WL, Dhainaut JF, Yan SCB, Helterbrand JD, Seger M, Johnson G III, Small DS. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of drotrecogen alfa (activated) in patients with severe sepsis. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 391-402

- 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, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Blood* 2003; 101: 20-30
- Mannironi C, Di Narbo A, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP. In vitro selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry* 1997; 36: 9726-9734
- Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 683-694
- Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* 1994; 74: 1-23
- Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 1982; 59: 1067-1072
- Mayer G, Famulok M. Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche. *Pharm Unserer Zeit* 6/2007; 36: 432-436
- Meier-Hellmann A, Kretz F-J., Teufel F.: *Anästhesie und Intensivmedizin. Sepsis.* Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006, 554-562
- Meier-Hellmann A. Was ist gesichert an den neuen Sepsismedikamenten? *Anästh Intensivmed* 2004; 45: 81-96
- Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofaktor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 66-74
- Müller J, Freitag D, Mayer G, Pötzsch B. Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase. *J Thromb Haemost.* 2008; DOI:10.1111/j.1538-7836.2008.03162.x

Müller J, Isermann B, Dücker I, Salehi M, Meyer M, Friedrich M, Madhusudhan T, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. An exosite-specific ssDNA aptamer inhibits the anticoagulant functions of activated protein C and enhances inhibition by protein C inhibitor. *Chem Biol* 2009; 16: 442-51

Müller J, Wulffen B, Pötzsch B, Mayer G. Multi-domain targeting generates a high affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chem Bio Chem* 2007; 8: 2223-2226

Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham Jr. ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Drug Discovery* 2006; 5: 123-132
Review

Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, Hoyer L, Kaufman RJ, Ginsburg D. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. *Blood* 1996; 88: 1183-1187

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

Nieuwlandt D, Wecker M, Gold L. In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry* 1995; 24: 5651-5659

Nimjee SM, Rusconi CP, Harrington RA, Sullenger BA. The potential of aptamers as anticoagulants. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 41-45

Osterud B, Björklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23 Review

Pan CQ, Lazarus RA. Ca^{2+} -dependent activity of human DNase I and its hyperactive variants. *Protein Science* 1999; 8: 1780-1788

Pötzsch B. Die APC-Dysfunktion: eine diagnostische Herausforderung. *Vascular Care* 2007; 12: 40-50

Pötzsch B./Madlener K. Gerinnungskonsil. Stuttgart-New-York: Thieme 2002: 18-49; 212-224

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

Ragni MV, Winkelstein A, Kingsley L, Spero JA, Lewis JH. 1986 Update of HIV seroprevalence seroconversion, AIDS incidence and immunologic correlates of HIV infection in patients with hemophilia A and B. *Blood* 1987; 70: 786-790

Reddi, Holland JF. Elevated Serum Ribonuclease in patients with Pancreatic Cancer. *PNAS* 1976; 73: 2308-2310

Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 2004; 103: 1192-1201

Riewald M, Ruf W. Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit care* 2003; 7: 123-129

Romig TS, Bell C, Drolet DW. Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 731: 275-284

Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-1173

Ruckman J, Green LS, Beeson J, Wangh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjic N. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF 165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 20556-20567

Ruf W, Rehmtulla A, Edington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor activity. *J Biol Chem* 1991; 266: 2158

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1335-1342

Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G Jr., Scardino E, Fay WP, Sullenger BA. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat. Biotechnol* 2004; 22: 1423-1428

Rusconi CP, Scardino E, Layzer J, Pitoc GA, Ortel TL, Monroe D, Sullenger BA. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor Ixa. *Nature* 2002; 419: 90-94

Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 1997; 78: 392-395 Review

Salehi M. Funktionelle Charakterisierung von aktivierten Protein C erkennenden DNA-Aptameren. Diplomarbeit 2007

Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chan HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. Aptamers evolved from live cells an effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11838-11843

Shapiro AD, Di Paolo J, Cohen A, Pasi KJ, Heisel MA, Blanchette VS, Abshire TC, Hoots WK, Lusher JM, Negrier C, Rothschild C, Roth DA. The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia. *Blood* 2005; 105: 518-525

Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH, Brugge JS. Tyrosine Phosphorylation of pp125^{FAK} in Platelets Requires Coordinated Signaling through Integrin and Agonist Receptors. *J of Biological Chemistry* 1994; 269: 14738-14745

Shen L, Dahlbäck B, Villoutreix BO. Tracking structural features leading to resistance of activated protein C to α -antitrypsin. *Biochemistry* 2002; 39: 2853-2860

Shetty S, Vora S, Kulkarni B, Mota L, Vijapurka M, Quadros L, Ghosh K. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. *British Journal of Haematology* 2007; 138: 541-544

Starita C, Patel M, Katz B, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib (macugen) in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* 2007; 39: 122-148 Review

Stoltenburg R. Aptamere- neue molekulare Erkennungselemente. Helmholtz, Zentrum für Umweltforschung (UFZ). Stand: 13.9.2007; URL:<http://www.ufz.de/index.php?de=13024>

Suzuki K, Nishioka J, Kusumoto H, Hashimoto S. Mechanism of inhibition of activated protein C by protein C inhibitor. *J Biochem (Tokyo)* 1994; 95: 187-195

Tuerk C, Gold L. Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505-510

Varadi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC- mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost* 1996; 76: 208-214

Vianello F, Belvini D, Dal Bello F, Tagariello G, Zanon E, Lombardi AM, Zerbinati P, Girolami A. Mild bleeding diathesis in a boy with combined severe haemophilia B (C(10400)>T) and heterozygous factor V Leiden. *Haemophilia* 2001; 7: 511-514

Vos HL. Inherited defects of coagulation factor V: the thrombotic side. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 35-40

Weiss C, Jelkmann W. *Physiologie des Menschen* (Schmidt RF., Thews G., Lang F.): Funktionen des Blutes. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 2000: 411-423

Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997; 337: 688-698

White GC, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* 1997; 78: 261-265

White RR, Sullenger BA, Rusconi CP. Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest* 2000; 106: 929-934

Witt I, Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie: Hämostaseologie*. Stuttgart-New-York: Thieme 2003: 280-312

Wlotzka B, Leva S, Eschgfäller B, Burmeister J, Kleinjung F, Kaduk C, Muhn P, Hess-Stump H, Klussmann S. In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer : an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8898-8902

Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H. Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovascular Research* 2005; 66: 276-285

Yan AC, Bell KM, Breeden MM, Ellington AD. Aptamers: prospects in therapeutics and biomedicine. *Front Biosci* 2005; 10: 1802-1827

Ye J, Esmon NL, Esmon CT, Johanson AE. The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin. Two distinct structural changes are detected by fluorescence, but only one correlates with protein C activation. *J Biol Chem* 1991; 266: 23016-23021

Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conrad J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89: 397-402

Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3406-3415

Danksagungen

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Bernd Pötzsch, Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, für die Bereitstellung des sehr interessanten Promotionsthemas und Betreuung dieser Dissertation.

Dr. Jens Müller, der mich in der Doktorandenzeit von Anfang an begleitet hat und bei Fragen stets zur Seite stand. Besonders bedanken möchte ich mich auch für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion, für immer neue Ideen und konstruktive Hinweise, auch bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere denen der Abteilung von Prof. Dr. B. Pötzsch, durch die eine sehr freundliche und angenehme Arbeit möglich war.

Ich danke dem Zweitgutachter Prof. Dr. Michael Ludwig für die Begutachtung meiner Arbeit.

Max Friedrich für angenehme gemeinsame Monate im Labor mit Kaffeepausen und viel Zeit zur konstruktiven Diskussion.

Dr. Jens Müller, Julia Fischer und Nikolas Busch für das Korrekturlesen dieser Dissertation und in der Unterstützung vor allem in der letzten Phase der Arbeit.

Meiner langjährigen Freundin Julia Fischer für ihre besondere Hilfe.

Meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und motiviert haben.

Schließlich meiner Freundin Linda Wilbers für Ihre Liebe und Unterstützung.