

Die modulierende Wirkung von Aptameren auf die Eigenschaften und  
Funktionen von Thrombin

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

Moritz Bernhard Reul

aus Mönchengladbach

2012

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Ludwig

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.05.2012

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin

Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Für meine Eltern



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Einführung	10
1.2	Grundlagen	11
1.2.1	Blutgerinnung: Physiologie	11
1.2.1.1	Primäre Hämostase	12
1.2.1.2	Sekundäre Hämostase	13
1.2.2	Thrombin	16
1.2.3	Hemmende Faktoren der Blutgerinnung	19
1.2.4	Therapeutische Möglichkeiten in der Antikoagulation	21
1.2.5	Fibrinolyse	23
1.3	Aptamere	24
1.3.1	SELEX-Verfahren und Modifizierung von Aptameren	25
1.3.2	Aptamere gegen Thrombin	27
1.3.3	Fusionsaptamere	28
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	30
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>32</b>
2.1	Materialien	32
2.1.1	Verwendete Chemikalien	32
2.1.2	Verwendete Reagenzien	32
2.1.3	Verwendete Materialien	34
2.1.4	Verwendete Geräte	35
2.2	Methodik	36
2.2.1	Bestimmung der amidolytische Aktivität des Thrombins	36
2.2.2	Antithrombin im gereinigtem System	37
2.2.3	Antithrombin im Plasma	39
2.2.3.1	Herstellung von defibrinisierten Plasma	39

2.2.3.2	Thrombingenerierungs-Assay (TGA)	39
2.2.3.3	Bestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT-ELISA)	41
2.2.4	Aptamerwirkung auf die Thrombomodulin-Thrombinbindung	44
2.2.4.1	Thrombomodulin-vermittelte Thrombinmodulation im gereinigtem System	44
2.2.4.2	Thrombingenerierungs-Assay (TGA)	46
2.2.5	Software und Datenanalyse	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1	Einfluss der Aptamere auf die amidolytische Thrombin-Aktivität	48
3.2	Einfluss der Aptamere auf die Inhibition von Thrombin durch Antithrombin im gereinigtem System	49
3.2.1	Inhibition von Thrombin durch Antithrombin und Heparin	49
3.2.2	Konzentrationsabhängige Aptamerwirkung auf die Inhibition von Thrombin durch AT	51
3.2.3	Aptamer-vermittelte Blockierung der Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Zeit	56
3.2.4	Einfluss der Aptamere auf die Inhibition von Thrombin durch Antithrombin in der Plasmamatrix	58
3.2.4.1	Thrombingenerierungs-Assay (TGA)	58
3.2.4.2	Bestimmung von Thrombin-Antithrombin Komplexen (TAT Elisa)	66
3.3	Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin im gereinigtem System	68
3.3.1	Konzentrationsabhängiger Einfluss der Aptamere	68
3.3.2	Zeitabhängiger Einfluss der Aptamere	70
3.3.3	Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin in der Plasmamatrix	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
4.1	Einleitung	82
4.2	Inhibition der amidolytischen Thrombinaktivität	82
4.3	Die modulierende Aptamerwirkung auf die Antithrombin-Thrombin Interaktion	85

4.3.1	Blockierung der AT Inhibition	85
4.3.2	Die Rolle des Heparins	86
4.3.3	Die Rolle der Phospholipide	87
4.4	Zeitabhängige Aptamerwirkung	87
4.5	Aptamerverhalten im Plasma	88
4.5.1	Einfluss der Aptamere auf die Thrombinaktivierung im Plasma	89
4.5.2	Einfluss der Aptamere auf die Thrombinaktivität im Plasma	90
4.5.3	Einfluss der Aptamere auf die Thrombininhibition im Plasma	91
4.6	Die Aptamerwirkung auf die Thrombomodulin-Thrombin Interaktion	91
4.6.1	Einfluss der Aptamere auf die Thrombomodulin-Thrombin-Bindung	92
4.6.2	Zeitabhängige Aptamerwirkung	92
4.6.3	Thrombomodulin Wirkung im Plasma	93
4.6.4	Die kombinierte Wirkung der Aptamere und Thrombomodulin auf Thrombin	94
4.7	Die Aptamerwirkungen im Vergleich	95
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
D	Dalton
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FDP	Fibrinspaltprodukt
GP	Glykopeptid
Ig	Immunglobulin
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
K	Kallikrein
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
M, -M	Molmasse
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
nM	Nanomolar
PAF	Platelet-Activating Factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion



PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ -Konzentration
PL	Phospholipide
PP	Poolplasma
RSL	Reactive Site Loop
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SELEX	Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification
TAFI	Thrombin-Activatable Fibrinolytic Activator
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
t-PA	Tissue-Type-Plasminogen-Activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Unit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Die Hämostase ist ein für das Überleben wichtiger Prozess, der den Wundverschluss garantiert. Die wichtige Funktion für den Organismus besteht in der Vermeidung eines größeren Blutverlustes und der Erzeugung einer Grundlage für die Wundheilung. Zugleich muss eine über den Endotheldefekt hinausgehende, unkontrollierte Gerinnung verhindert werden. Dieses Gleichgewicht zwischen den gerinnungsfördernden, -hemmenden und fibrinolytischen Prozessen ist Voraussetzung dafür, dass das Blut seinen physiologischen Aufgaben als Transportmedium nachkommen kann (*Bajzar, 2000*). In Falle einer Störung dieses Gleichgewichtes kann es entweder zu einer Thromboseneigung oder zu einer erhöhten Blutungsgefahr kommen (*Rau et al., 2007*).

Der Prozess der Hämostase ist aus einer Reihe von unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt, die über eine Vielzahl von Verbindungen in Bezug zueinander stehen. Die Hämostase lässt sich in drei Hauptbestandteile einteilen: die vaskuläre, die zelluläre und die plasmatische Komponente (*Barthels et al., 2008*). Eine weitere Möglichkeit, die komplexe Blutgerinnung didaktisch vereinfacht einzuteilen, ist die Gliederung nach dem zeitlichen Ablauf. Hier unterscheidet man eine primäre Hämostase (Hauptbestandteil sind die vaskulären und zellulären Komponenten, die eine vorläufige Blutstillung erzeugen) von einer sekundären Hämostase (mit den Hauptbestandteil der plasmatischen Gerinnung). Nur das Zusammenspiel aller Komponenten führt zu einer ausreichenden Blutstillung (*Gerlach et al., 1993*).

Die Serinprotease Thrombin stellt das zentrale Enzym der sekundären Hämostase dar, welches sowohl den entscheidenden Schritt der Fibrinogenierung katalysiert (*Mosesson, 2005*) als auch zahlreiche Feinabstimmungen zwischen der plasmatischen Gerinnung und den zellulären Komponenten der Blutstillung dirigiert (*Coughlin, 2005*). Diese Bedeutung von Thrombin findet auch in der therapeutischen Modulation der Blutgerinnung Ausdruck, da eine Reihe von Medikamenten Thrombin als Zielmolekül besitzen, so zum Beispiel Heparin und Bivalirudin (*Nutescu et al., 2008; Warkentin, 2004*).

Mit der Entwicklung von DNA-Aptameren (einzelsträngige DNA Moleküle), die hochspezifisch an Moleküle binden und sie beeinflussen können, ist es nun möglich, gezielt einzelne Oberflächenstrukturen des Thrombinmoleküls zu blockieren, die für die unterschiedlichen Interaktionen von Bedeutung sind (*Bode, 2005*). So konnte in einer Reihe von funktionellen Tests die Inhibition

der Thrombinaktivität durch die Aptamere HD1 (*Bock, 1992; Griffin, 1993*) bzw. HD22 (*Tasset, 1997*) dargestellt werden. 2007 entwickelte eine Bonner Forschergruppe ein Fusionsaptamer (HD1-22), welches aus diesen beiden Aptameren zusammengesetzt wurde und konnte damit ein Aptamer konstruieren, welches in dem Bindungsverhalten und der modulierenden Wirkung auf das Zielmolekül Thrombin den einzelnen Aptameren überlegen war (*Müller et al., 2007*).

Durch die hohe Spezifität der Aptamere an den Bindungsstellen des Thrombins (Exosite 1 und 2) wird das Thrombinmolekül nicht einfach vollständig blockiert, wie etwa durch Antithrombin (AT), sondern in seiner Funktion, in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration, mit den unterschiedlichen Bindungspartnern moduliert. Aus diesem Grund ist es für die antikoagulative Aptamertherapie von Bedeutung, die Wirkung der Aptamere auf die unterschiedlichen Bindungspartner des Thrombins zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war es, einerseits die aptamerabhängige Beeinflussung der Thrombinbindungspartner Antithrombin (AT), Thrombomodulin und Heparin darzustellen in Verbindung mit der Untersuchung der Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe unter physiologischen Bedingungen und so eine genauere Charakterisierung der Aptamerwirkung auf die gesamte Hämostase zu konstruieren und andererseits mit der Fähigkeit der Aptamere, gezielt nur einzelne Exosites des Thrombinmoleküls zu beeinflussen, genauere Erkenntnisse über die intramolekulare Funktionen der Hauptbindungsstellen (Exosite 1 und 2) zu erlangen.

## 1.2 Grundlagen

### 1.2.1 Blutgerinnung: Physiologie

Wenn es im Körper zu einer Verletzung kommt und Gefäße beschädigt werden, ist es für das Überleben des Organismus wichtig, dass diese Blutung innerhalb kurzer Zeit gestoppt wird und die Gefäße dauerhaft verheilen. Den Vorgang dieser Blutstillung nennt man Hämostase. Er lässt sich einteilen in die primäre und die sekundäre Hämostase. In der primären Hämostase sind die korpuskulären und vaskulären Anteile vorherrschende Hauptbestandteile, in der sekundären Hämostase die plasmatische Gerinnung, welche eine effektive Blutstillung bewirken. Nachdem der Defekt verschlossen wurde, muss der Thrombus wieder aufgelöst werden können. Dies geschieht mittels eines fibrinolytischen Systems, damit ein regelhafter Blutfluss gewährleistet werden kann (*Cesarman-Maus und Hajjar, 2005*). Das Blut kann seiner Hauptaufgabe, nämlich als Transport-

medium zu dienen, nur entsprechen, wenn diese beiden gegensätzlichen Systeme in Balance stehen und es weder zu einem großen Blutverlust noch zu einem Überschuss an intravasaler Gerinnung kommt.

#### 1.2.1.1 Primäre Hämostase

Nach einer Verletzung des Endothels kommt es innerhalb von 2 bis 4 Minuten zu einer vorläufigen Blutstillung (*Silbernagel und Despopoulos, 2007*). Verantwortlich hierfür sind in dieser frühen Phase hauptsächlich zwei Mechanismen: die Vasokonstriktion und die Thrombozytenfunktion. Die Vasokonstriktion wird durch eine auf den Verletzungsreiz reagierende, reflektorische Kontraktion glatter Muskelzellen in den Arterien und Arteriolen ausgelöst und durch die Ausschüttung vasokonstriktorischer Substanzen (Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin, Katecholamine) aus der verletzten Gefäßwand und von aktivierten Thrombozyten noch verstärkt (*Barthels et al., 2008*). Diese Verengung der vorgeschalteten Blutgefäße erzeugt einen langsameren Blutfluss und erleichtert so den Ablauf der primären und sekundären Hämostase.

Thrombozyten sind kernlose, scheibenförmige Abschnürungen aus den Megakaryozyten im Knochenmark mit einem Durchmesser von lediglich 1-3 Mikrometern. Die Thrombozyten zirkulieren auf Grund der hydrodynamische Margination am äußeren Rand des Blutflusses, in unmittelbarer Nähe zum Endothel und können somit bei Vorliegen einer Endothelschädigung schnell aktiviert werden (*Gawaz, 2004*). Subendotheliale Kollagenfasern, die im Falle einer Endothelschädigung mit den Thrombozyten in Kontakt geraten, werden entweder direkt über Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran (GP Ia/IIa) oder über den im Plasma zirkulierenden und subendothelial deponierten von-Willebrand-Faktor (vWF) gebunden (*Nurden und Nurden, 1993*). Der vWF, sezerniert von den Endothelzellen und Megakaryozyten, festigt die Adhäsion der Thrombozyten, indem er die Bindung zwischen Kollagen und dem GP Ib/IX auf der Thrombozytenmembran verstärkt (*Hoylaerts, 1997*). Nach dieser Adhäsion können die Thrombozyten höheren Strömungskräften widerstehen und die Bindung der Glykoproteine setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen. Hierbei unterstützen eine Reihe von Substanzen die Aktivierung der Thrombozyten (z.B. Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub>, ADP, Komplementfaktoren und Vasopressin die Aktivierung der Thrombozyten (*Kehrel, 2008*).

Nach der Aktivierung verändern die Thrombozyten ihre Form, so dass kugelartige Zellen entstehen, die mit cytoplasmatischen Fortsätzen oder Pseudopodien ineinander greifen (*Andrews et al., 1998*). Im Zuge dieser Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa

Rezeptors auf der Thrombozytenmembran, so dass dieser auch lösliche Liganden mit einer hohen Affinität binden kann, wie zum Beispiel Fibrinogen und vWF (*Steinhubel et al., 2005*). Diese beiden Moleküle dienen als Verbindungsbrücken zwischen den aktivierten Thrombozyten. Des Weiteren werden, vor allem aus den Alpha-Granula und den Lysosomen der angehefteten Thrombozyten, verschiedenen Mediatoren sezerniert, die die Adhäsivität und Aktivierung der Thrombozyten verstärken, wie zum Beispiel ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> (*Stegner und Nieswandt, 2011*). Die aktivierten Thrombozyten nehmen auch Einfluss auf die plasmatische Gerinnung durch die Expression von Phospholipiden (PL), die als Matrix für die Faktoraktivierung wirken. Für die Wundheilung, Angiogenese und letztendlich für die Wiederherstellung eines intakten Endothels werden Kallikrein, für die Bradykinin Synthese (Entzündungsmediator) und PDGF als Aktivator für den Zellwachstum sezerniert (*Gao et al., 2010*).

Die Adhäsion und Ausbildung von Pseudopodien zwischen den Thrombozyten ist zunächst noch reversibel. Das kombinierte Wirken von Thrombin (auch hier wird die Vernetzung von zellulärer und plasmatischer Gerinnung deutlich) und ADP auf die Zellen führt jedoch zu einer Membranauflösung und damit irreversiblen Verschmelzung (*Baruch, 2006*). Der gesamte Prozess der Thrombozytenaktivierung, der schließlich in der irreversiblen Aggregation endet, mit allen morphologischen, chemischen und funktionellen Veränderungen, wird als visköse Metamorphose bezeichnet (*Jackson et al, 2009*).

Aus dem vorbeiströmende Blut lagern sich, ähnlich einem Schneeballeffekt, mehr und mehr Blutplättchen an das wachsende Aggregat an und es entsteht eine hämostatische Pfropf (weißer Thrombus ohne eingelagerte Erythrozyten), der bei einer ausreichenden Größe in der Lage ist, den Endotheldefekt nach ein bis drei Minuten provisorisch zu verschließen. Es folgen Umbauprozesse, die mit der Einwanderung und dem Einbau von Leukozyten und Erythrozyten zu einem schwer auflösbaren roten Pfropf führen (*Pötzsch und Madlener, 2002*).

#### 1.2.1.2 Sekundäre Hämostase

Die Thrombozyten, die Hauptkomponenten der primären Hämostase, sind zwar in der Lage, den Endotheldefekt vorläufige zu decken und eine Blutstillung herbeizuführen, der weiße Thrombus kann jedoch nicht einen endgültigen Verschluss herbeiführen. Hier spielt nun die sekundäre Hämostase, die zeitgleich abläuft, eine wichtige Rolle, indem sie für den endgültigen Verschluss der Läsion sorgt. Als Bestandteile dieser Phase des Wundverschlusses können 15 Faktoren beschrie-

ben werden, die in einem kaskadenartigen System interagieren (siehe Abbildung 1) und in der Bildung von Fibrin münden, welches für die Organisation und Festigkeit des Thrombus essentiell ist. Eine Einteilung in drei Schritte (exogene und endogene Thrombinbildung, Fibrinbildung und der Bildung des roten Thrombus) ist für das Verständnis erleichternd, aber nicht zwingend voneinander abgrenzbar, da es zahlreiche positive und negative Feedback-Schleifen gibt, die zwischen den einzelnen Schritten wirken (Norris *et al.*, 2003).

Die einzelnen Faktoren (Proteine/Enzyme) des plasmatischen Gerinnungssystems werden überwiegend in der Leber synthetisiert. Einige Faktoren (II, VII, IX und X) sind in ihrer Synthese Vitamin K-abhängig, welches als Cofaktor an der posttranslationalen gamma-Carboxylierung einer Reihe von N-terminalen Glutamatresten mitbeteiligt ist (Wu *et al.* 1991). Diese entstehenden Carboxylglutamylgruppen sind starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren und wirken bei der  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelten Verankerung der Faktoren an Phospholipidflächen mit (Huang *et al.*, 2003).

Die Phospholipide (PL), in erster Linie saure Phosphatidylserine, werden im Zuge der Thrombozytenaktivierung durch einen Flip-Flop-Mechanismus auf die äußere Membran transportiert (Sims *et al.*, 1989). Diese PL dienen im Komplex als Matrix für die durch Calcium vermittelte Verbindung mit den Gerinnungsfaktoren und sind in mehreren Schritten der Kaskade von entscheidender Bedeutung (Thomas, 2002). So kann man durch Einsatz von Citrat oder EDTA, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden, die gesamte Blutgerinnung unterbinden. Dieser Effekt wird in einer Reihe von Blutuntersuchungen ausgenutzt (Banfi *et al.*, 2007).

Nach der Synthese zirkulieren die meisten Faktoren in ihrer inaktiven Form (Zymogen) mit verschiedenen biologischen Halbwertszeiten (je nach Faktor zwischen 5 und 250 Stunden) im Blut, um erst am Ort des Bedarfs aktiviert zu werden (Loew 1990). Die meisten Faktoren besitzen einen enzymatischen Charakter oder wirken als Cofaktor in der Gerinnungskaskade (Stassen *et al.*, 2004). Die Aktivierung erfolgt hierbei meist mittels limitierter Proteolyse. Typischerweise entstehen aus einer Polypeptidkette zwei Ketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind und erst in dieser Form das Aktive Zentrum als zugänglich präsentieren (Chen *et al.*, 2006).

Das Endprodukt, das durch die Gerinnungskaskade mit den unterschiedlichen Aktivierungswegen entsteht, ist ein kovalent gebundenes Fibrinnetz, dessen Aufgabe in dem Zusammenhalt des Thrombus liegt.

#### Die Thrombingenerierung

Prinzipiell kann die Aktivierung des Thrombins auf zwei unterschiedlichen Wegen ablaufen,

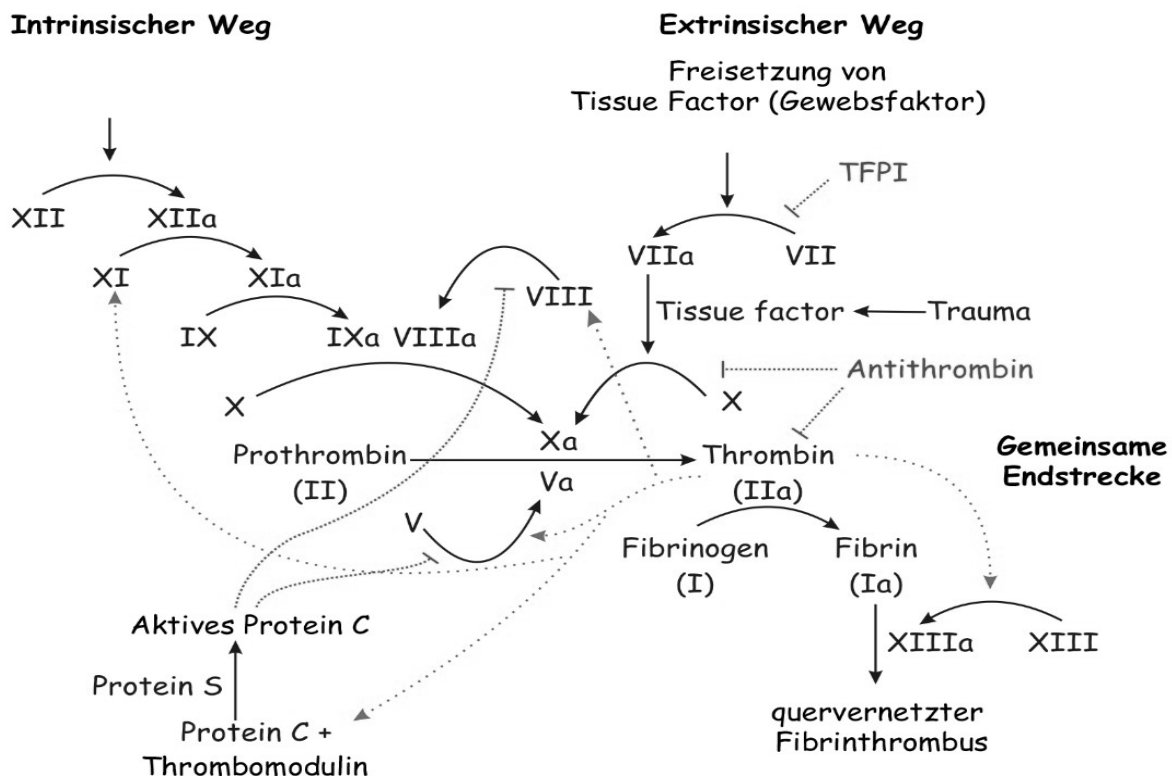
welche als extrinsische und intrinsische Wege bezeichnet werden. Beide Wege laufen mit der Aktivierung des Faktors X zusammen. Eine schematische Darstellung der Gerinnungskaskade findet sich in Abbildung 1.

Zu Beginn des intrinsischen (endogenen) Weges steht die Kontaktaktivierungsphase, in der Faktor XII im Komplex mit hochmolekularen Kinogen (HMWK), Präkallikrein und Kallikrein an negativ geladenen Oberflächen zu Faktor XIIa aktiviert wird. Dies geschieht in vivo zum Beispiel an negativ geladenen subendothelialen Kollagenfasern oder in vitro an einer Glasoberfläche (*Colman und Schmaier, 1986*). Faktor XIIa aktiviert in einer positiven Rückkopplung Präkallikrein zu Kallikrein und verstärkt somit die Aktivierung seiner selbst (*Silbernagel und Despopoulos, 2007*). Als nächstes aktiviert Faktor XIIa proteolytisch den Faktor XI, dieser aktiviert wiederum den Faktor IX. Der Faktor IX bildet mit dem durch Thrombin aktivierten Faktor VIIIa,  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipiden, auf der Membran aktivierter Thrombozyten, den Faktor-X-Aktivator-Komplex (endogene Tenase), der Faktor X zu Faktor Xa aktiviert (*Baglia et al., 2002*). In diesem Komplex hat der Faktor VIIIa keine Enzymfunktion, aber er beschleunigt als Cofaktor die Aktivierung von Faktor X um das 1000-fache (*Rawala-Sheikh et al., 1990*).

Der extrinsische (exogene) Weg der Gerinnungsaktivierung ist schneller und beinhaltet initial nur einen Aktivierungsschritt. Der Gewebefaktor (Tissue Factor [TF]) aktiviert den Faktor VII und bildet die exogene Tenase (Faktor-X-Aktivierungskomplex) (*Morrissey, 2001*), bestehend aus Faktor VIIa, TF, PL und  $\text{Ca}^{2+}$ . Der Tissue Factor, ein Komplex aus einem Protein und einem Phospholipid-Anteil, ist der einzige membrangebundene Faktor des plasmatischen Gerinnungssystems (*Breitenstein et al., 2009*). Er wird bei Gewebsverletzungen aus beschädigten Zellen freigesetzt und kommt im Blut zirkulierend nur in geringer Konzentration vor (*McVey et al., 1999*). Faktor VIIa aktiviert nicht nur Faktor X und mündet in den gemeinsamen Aktivierungsweg von Thrombin, sondern aktiviert außerdem den auch in der endogenen Aktivierung vorkommenden Faktor IX (*Mackman et al., 2007*). Hier kommt es zu einer Interaktion zwischen dem endogenen und exogenen Aktivierungsweg und vermutlich ist dieser Schritt ein wichtiger Auslösemechanismus für die Gerinnung, da ein Faktor IXa-Mangel zu schweren Störungen in der Blutgerinnung führen kann (*Schmidt und Bajaj, 2003*).

Mit der Bildung von Faktor Xa über den endogenen und den exogenen Weg ist die gemeinsame Strecke der Gerinnungskaskade erreicht, die in der Aktivierung von Prothrombin mündet. Faktor Xa bildet einen Komplex, vermittelt durch  $\text{Ca}^{2+}$ , auf Phospholipidoberflächen, der durch die Anla-

gerung des aktivierten Kofaktors Faktor Va in seiner Aktivität um das 1000-fache beschleunigt wird (Tans et al., 1997). Dieser Komplex, bestehend aus Faktor Xa, Faktor Va,  $\text{Ca}^{2+}$ , PL, wird Prothrombinase genannt und aktiviert Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) (Steen, 2002).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der sekundären Hämostase, bestehend aus dem intrinsischen und extrinsischen Weg. Dargestellt sind zusätzlich die Inhibitoren der Gerinnung: TFPI, Antithrombin und das Protein C/Protein S System. Quelle: [www.commonswiki.org](http://www.commonswiki.org)

### 1.2.2 Thrombin

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, läuft die gesamte sekundäre Hämostase auf die Aktivierung des Prothrombins hinaus. Thrombin ist aber nicht nur in der Lage Fibrinogen zu aktivieren und somit den Schlüssel für eine dauerhafte Blutstillung in Form der vernetzten Fibrinfäden zu generieren, sondern wirkt modulierend auf die gesamte Gerinnungskaskade (beschleunigend und hemmend), auf die Thrombozytenaktivität und eine Vielzahl anderer Zellen (Coughlin,



2005). Auf Grund der zentralen Rolle in der Blutgerinnung und der Bedeutung für diese Arbeit wird das Thrombin hier in einem separaten Kapitel vorgestellt.

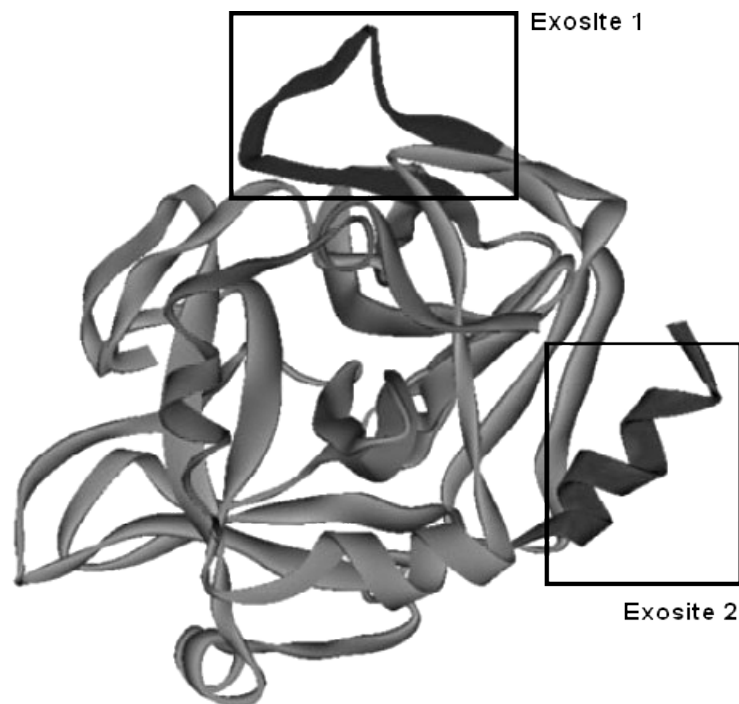
Wie ein überwiegender Teil der trypsinähnlichen Serinproteasen besteht auch Thrombin aus zwei Proteinketten, einer leichten Kette (aus 36 Aminosäuren bestehend) und einer schweren Kette (259 Aminosäuren), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Es befinden sich mehrere ladungsbedingte Oberflächenstrukturen auf dem Molekül, die für die Interaktion mit Substraten, Rezeptoren und Kofaktoren nötig sind (Bode, 2005).

Das Aktive Zentrum besteht aus einer eng geformten Tasche, auf deren Boden sich die Carboxylatseitenkette des Aspartats 189 befindet. Diese Tasche wird auf der einen Seite durch eine antiparallele Faltblattstruktur, auf der anderen Seite durch eine  $\beta$ -Schleife begrenzt. Im Gegensatz zu dem unspezifischen Verdauungsenzym Trypsin, welches eine ähnliche Struktur besitzt und auch zu der Klasse der Serinproteasen gehört, bilden eine Reihe von zusätzlichen Ketteninsertionen eine Bindungstasche, die die „active-site“ verengen und vertiefen und so eine höhere Substratspezifität erzeugen (Stubbs und Bode, 1993). Die molekulare Struktur des Thrombins findet sich in Abbildung 2 dargestellt.

An der Oberfläche des Thrombins befinden sich zwei positiv geladene „Exosites“ (auch Anionenbindungsregionen genannt), die das Aktive Zentrum flankieren und für die Orientierung der Substrate, aber auch für die Inhibition von Thrombin verantwortlich sind:

**Exosite 1**, als positiv geladene Struktur, auch Fibrinogenbindungsstelle genannt, bindet folgende Moleküle und Substanzen: Fibrinogen, Faktor XI, Faktor XIII, Faktor V, Faktor VIII und Thrombomodulin (Kretz, 2006). Zusätzlich bindet an diese Exosite auch der Thrombininhibitor Hirudin.

**Exosite 2**, oder Heparinbindungsstelle, bindet Heparin, GPIb/IX, und sie ist an der Aktivierung der Faktoren V und VIII beteiligt (Adams, 2006). Die stark elektropositive Wirkung der Exosite 2 kommt durch die Aminosäuren Arginin und Lysin zustande, die bevorzugt mit den sulfatierten Polysacchariden des Heparins elektrostatische Wechselwirkungen eingehen (Bode, 1992). Beide Exosites liegen etwa 3,4 Nanometer voneinander entfernt (Hasegawa et al., 2008). Zusätzlich befindet sich eine  $\text{Na}^+$  Bindungsstelle 15 Å von dem Aktiven Zentrum entfernt (Di Cera et al., 1995). Die Bindung von  $\text{Na}^+$  scheint große Auswirkungen auf die Funktion und allosterische Konfiguration des Moleküls zu haben; so unterscheidet man eine langsame  $\text{Na}^+$ -freie Form (in vivo etwa 40 % vorkommend) von einer  $\text{Na}^+$ -gebundenen schnellen Form (60 % in vivo) (Gandhi et al., 2008).



**Abb. 2:** Molekularstruktur des Thrombins. Dargestellt in Form einer Bandstruktur. In den Kästen hervorgehoben sind die beiden Exosites. Quelle: Müller J, Wulffen B, Pötzsch B, Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chembiochem.* 2007; 8: 2223-2226

Ähnlich wie andere Gerinnungsfaktoren ist auch Thrombin die aktivierte Form eines Zymogen mit dem Namen Prothrombin, ein einkettiges Glykoprotein, aus 579 Aminosäuren bestehend (Pötzsch und Madlener 2010). Prothrombin wird als Prä-Pro-Zymogen Vitamin-K-abhängig synthetisiert und nach posttranslationaler Modifizierung ins Blut abgegeben. Die Konzentration für Prothrombin im Plasma beträgt  $1,2 \mu\text{M}$  (Mankovich, 1984). Die Aktivierung des Prothrombins geschieht nun über zwei Spaltungen durch Faktor Xa zwischen Arg271 und Thr272, welches die Ablösung der Prodomäne (37 kDa) von der katalytischen Domäne (37 kDa) bewirkt und die Entstehung eines Vorläuferenzym, Präthrombin-2, hervorruft. Eine erneute Spaltung innerhalb der katalytischen Domäne zwischen den Aminosäuren Arg320 und Ile321 erzeugt eine leichte Kette und eine schweren Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und so die aktive Form des Thrombins bilden (Anderson et al., 2003). Hervorzuheben ist noch die Tatsache, dass die Exosite 1 im Prothrombinmolekül teilweise zugänglich ist, während die Exosite 2 erst nach Abspaltung der Prodomäne für Bindungen frei wird (Kretz et al., 2006).

## Fibringenerierung

Mit Hilfe der Exosite 1 und dem Aktiven Zentrum spaltet Thrombin von der A $\alpha$ - und B $\beta$ -Kette des langkettigen Fibrinogens die Fibrinopeptide A und B ab (*Mosesson, 2005*). Die dadurch geöffneten Enden des Fibrins polymerisieren nicht-kovalent zu einer dreidimensionalen Fibrinstruktur. Über die Exosite 1 aktiviert Thrombin außerdem Faktor XIII, der mit Einfügung von kovalenten Bindungen für eine irreversible Aggregation des Fibrinnetzes sorgt (*Kehrel, 2003*).

Die Aktivierung von Faktor V und Faktor VIII durch Thrombin an beiden Exosites (*Esmon 2003*) erzeugt eine positive Feedbackschleife, die es ermöglicht, die Thrombingenerierung um ein Vielfaches zu verstärken. Diese Verstärkung kommt durch die Kofaktor-Funktion der beiden Faktoren zu Stande. Faktor VIIIa ist hierbei Teil des Tenase-Komplexes, während Faktor Va Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes ist. Die Beschreibung der antikoagulatorischen Wirkungen, die von Thrombin ausgehen, insbesondere die Thrombomodulin vermittelten, findet sich im Kapitel 1.2.3.

## Bildung des roten Thrombus

Das nun entstandene Maschenwerk aus kovalent verbundenem Fibrin bewirkt, dass sich weitere Thrombozyten und Erythrozyten an den Thrombus anlagern und eingebaut werden.

Eine weitere Wirkung von Thrombin, neben der Interaktion mit Plasmaproteinen, ist die Signalwirkung auf Zellen des vaskulären Systems. Thrombin bindet an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR-1/PAR-3) auf der Membran von Thrombozyten und führt über ein G-Protein-vermittelten Aktivierung zu eine Plättchenadhäsion und Aggregation. Thrombin aktiviert ebenso über PAR-1 glatte Muskelzellen, Endothel-, Nerven- und Tumorzellen (*Coughlin, 2005*). Mit Hilfe dieser Bindung werden Proliferations- und Migrationsprozesse aktiviert, die den roten Thrombus umbauen und die bei dem Wundverschluss, der Angiogenese, aber auch bei atherosklerotischen Prozessen eine Rolle spielen (*Stouffer et al., 1998*).

### 1.2.3 Hemmende Faktoren der Blutgerinnung

Neben den proagulatorischen Faktoren spielen Inhibitoren zur Verhinderung von Gerinnungsvorgängen im physiologischen Blutfluss eine wichtige Rolle. Diese Inhibitoren regulieren und begrenzen die Gerinnungsvorgänge auf eine lokale Reaktion. Therapeutisch werden außerdem noch eine Reihe von Stoffen eingesetzt, die die körpereigenen gerinnungshemmenden Faktoren unters-

tützen, auf andere Weise die Gerinnungsfaktoren deaktivieren oder sogar schon deren Synthese blockieren.

Das normale Gefäßendothel wirkt antithrombogen. Diese Wirkung basiert auf Glykoproteinen in der Glykokalix, welche die Anheftung der Thrombozyten und die Aktivierung von kontaktsensiblen Gerinnungsfaktoren unterbinden. Zusätzlich werden gerinnungshemmende Substanzen von den Endothelzellen luminal sezerniert, wie Adenosin, Prostacyclin und NO (*Wu und Thiagarajan, 1996*). Einige dieser Substanzen bewirken einen intrazellulären Anstieg von cAMP und cGMP in den Thrombozyten. Dieser Anstieg hat eine verminderte Thrombozytenaktivierung, -aggregation und -sekretion zur Folge (*Walter et al., 1995*).

Wichtige Vertreter antikoagulatorisch wirkender Plasmaproteine bzw Systeme sind das Protein C-System, der „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) und das Antithrombin-Heparin-System.

Der **tissue factor pathway inhibitor (TFPI)** ist ein Polypeptid welches in der Lage ist, die Gerinnungskaskade lokal vollständig zu unterbrechen (*Golino et al., 2004*). Dies geschieht über die Inhibition von Faktor Xa und dem katalytischen Komplex Faktor VIIa/TF, wodurch TFPI eine wichtige Funktion in der Regulierung der Gerinnungskaskade einnimmt (*Lwaleed und Bass, 2006*).

**Antithrombin**, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa, welches zu der Gruppe der Serinproteasen-Inhibitoren (kurz SERPIN) gehört, hemmt viele Gerinnungsfaktoren des exogenen, endogenen und auch des gemeinsamen Weges: die Serinproteasen Thrombin, FXIIa, FXIa, FIXa, FVIIa, Kallikrein, uvm.. Zusätzlich hat AT eine antiinflammatorische Funktion, indem es an den Zellrezeptor Syndecan-4 bindet und so die intrazelluläre Signaltransduktion proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. der Lipopolysaccharide, herunter reguliert (*Roemisch et al., 2002*). Die höchste Affinität besitzt AT gegen Thrombin und FXa. AT wirkt dabei wie ein Pseudosubstrat, welches zunächst von der Serinprotease als Substrat erkannt wird und mit dem Aktiven Zentrum interagiert. Für die Erkennung des Substrates und die Reaktion an dem Aktiven Zentrum ist der „reactive site loop“ (RSL) des AT verantwortlich. Durch die nun folgende Spaltung einer Aminosäuresequenz im AT-Molekül wird AT in einem sogenannten Michaeliskomplex fixiert. In einem zweiten Schritt entsteht dann eine kovalente Esterbindung zwischen beiden Molekülen (*Pike et al., 2005*). Hierbei stellt **Heparin** einen Kofaktor dar, der die Wirkung des Antithrombin um das 1000-fache verstärkt.

**Protein C** ist eine Vitamin K-abhängige Serinprotease. Es kommt im Plasma als Zymogen vor und wird durch an endothelständig fixiertem Thrombomodulin gebundenen Thrombin aktiviert (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005*). Protein C wird von dem Thrombomodulin-Thrombin-Komplex in die aktive Form (APC) überführt und inaktiviert, in Zusammenarbeit mit dem Kofaktor Protein S, die Faktoren Va und VIIIa. Zudem spielt initial durch APC gespaltenen FV (FV<sub>ac</sub>) eine tragende Rolle bei der APC-vermittelten Inaktivierung von FVIIIa (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005*).

Dementsprechend hemmt Protein C den Ablauf der Gerinnungskaskade über einen negativen Feedbackmechanismus, spielt zusätzlich aber auch bei antiinflammatorischen und antiapoptotischen Prozessen eine Rolle (*Bernard et al., 2001*).

#### 1.2.4 Therapeutische Möglichkeiten in der Antikoagulation

Die therapeutische Verwendung von direkten Enzym-Inhibitoren, Heparin und Vitamin K-Antagonisten basiert auf der Hemmung der Gerinnung über drei folgende Mechanismen: 1. die direkte Molekülblockierung, 2. eine Beschleunigung der inaktivierenden Komplexbildung (Heparin) und 3. die verminderte Biosynthese funktionell aktiver Faktoren (Vitamin K-Antagonisten) (*Girolami et al., 2008*).

Zu den direkten Enzym-Inhibitoren gehören: Hirudin, Bivalirudin, Argatroban und Rivaroxaban. Hirudin wurde im letzten Jahrhundert in den Speicheldrüsen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) entdeckt. Mit der Einführung der molekularen Biotechnologie war es möglich, ein rekombinantes Hirudin in großen Mengen herzustellen. Hirudin verbindet sich in Anwesenheit von Thrombin zu einem Komplex, der die Wirkung des Thrombins irreversibel inaktiviert und auch noch außerhalb des physiologischen pH-Bereichs stabil ist (*Greinacher und Warkentin, 2008*). Die Inaktivierung beinhaltet nicht nur die Blockierung der proteolytischen Fibrinogenspaltung, sondern alle Interaktionen, die Thrombin normalerweise katalysiert, so zum Beispiel die Aktivierung der Faktoren V, VIII, XIII und die PAR-1/PAR-3 vermittelte Thrombozytenaktivierung (*Mureebe, 2007*). Obwohl die Stärke des Hirudins in einer schnellen direkten Inhibition des Thrombins besteht, ohne auf einen Co-Faktor, wie es z.B. bei Heparin und Antithrombin der Fall ist, angewiesen zu sein, birgt die therapeutische Nutzung jedoch die Risiken einer komplizierten, nur schwer zu beherrschenden Blutung (*Markwardt, 2002*). Dieses Risiko birgt natürlich jede antikoagulatorische Therapie,

doch durch die Weiterentwicklung des Hirudin zu Bivalirudin, welches nur reversibel an Thrombin bindet und mit einer geringen Halbwertszeit von 25 bis 80 Minuten gut zu steuern ist, konnte ein breiterer Einsatzbereich erschlossen werden (*Warkentin, 2004*). Agratroban ist ebenfalls ein reversibler direkter Hemmstoff, der das Thrombinmolekül hemmt. Dieser kann in der Antikoagulation bei Erwachsenen mit einer heparininduzierten Thrombozytopenie Typ II eingesetzt werden (*Babuin und Pengo, 2010*). Rivaroxaban ist ein neuer, oral verabreichter direkter Faktor Xa Inhibitor, der zur Klasse der Oxazolidinone gehört (*Perzborn et al., 2007*).

Das **Heparin** wirkt als Co-Faktor bei der AT Inhibition, indem es einen Komplex mit AT an der Heparinbindungsstelle eingeht und eine Konformationsänderung induziert, die eine bessere Zugänglichkeit des RSL (im AT Molekül) an die Serinprotease (z.B. Thrombin) bewirkt (*Nutescu et al., 2008*). Als weitere Wirkungsweise des Heparin ist ein so genannter Template Effekt beschrieben, bei dem größere Heparinmoleküle (länger als 26 Monosaccharide) in der Lage sind, eine molekulare Brücke zwischen Thrombin und AT zu bilden, welche die Anlagerung des AT erleichtert (*Huntington, 2003*). Abhängig von der Kettenlänge des Heparinmoleküls unterscheidet man zwischen niedermolekularem Heparin (5-17 Glykosaminoglykanen) und unfraktioniertem Heparin (ab 18 Glykosaminoglykane). Das niedermolekulare Heparin hemmt (in Kombination mit AT) dabei den Prothrombinasekomplex (bestehend aus Faktor X, Faktor V,  $\text{Ca}^{2+}$  und PL), wohingegen unfraktioniertes Heparin zusätzlich auch die AT-vermittelte Inaktivierung von Thrombin fördert. Die Wirkungsverstärkung des AT kommt dabei in erster Linie über den Template-Mechanismus, der eine Brücke zwischen Thrombin und AT formt, zustande (*Gettins, 2002*). Das Polysaccharid Heparin kommt zum einen in den Granula der basophilen Granulozyten und den Mastzellen vor, es kann aber auch therapeutisch verabreicht werden. Heparin hemmt außerdem die Plättchenadhäsion und Plättchenaggregation (*Lüllmann und Mohr, 1999*).

Die **Vitamin-K-Antagonisten** (die Cumarine) stellen eine weitere bedeutende Gruppe in der Antikoagulantientherapie dar. Cumarine greifen in einen Schritt der Biosynthese der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktor II, VII, IX und X, als auch Protein C und S) ein (*Oldenburg et al., 2008*). In der Biosynthese dieser Faktoren kommt es normalerweise zu einer  $\gamma$ -Carboxylierung am C-Atom der Aminosäure Glutamat. Diese Carboxylierung erhöht die negative Ladung der Faktoren und verbessert die Komplexbildung mit Calciumionen und Phospholipiden, welche positiv geladen sind (*Bandyopadhyay, 2008*). Cumarine, die eine Vitamin K-ähnliche Struktur aufweisen, binden kompetitiv an das Enzym Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und blockie-

ren so die  $\gamma$ -Carboxylierung. Die Wirkung zu Beginn einer Antikoagulationstherapie hat ihr Maximum allerdings erst nach 36 bis 48 Stunden, da die Hemmung nur bei neu synthetisierten Gerinnungsfaktoren einsetzt (*Stehle et al., 2008*).

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, ist das Thrombin also das zentrale Molekül der Blutgerinnung, da es sowohl den eigentlichen fibrinbildenden Schritt katalysiert als auch für zahlreiche pro- und antikoagulatorische Stoffe der Bindungspartner ist. Außerdem binden in der Antikoagulationstherapie Stoffe wie Hirudin das Thrombin und blockieren es direkt oder beschleunigen die Blockierung (im Fall des Heparins). Diese zentrale Rolle des Thrombins macht es zu einem primären Ziel, wenn man in die Blutphysiologie schnell und kontrolliert eingreifen möchte. Seit 1992 besteht auch die Möglichkeit mit Aptameren, die gezielt an Thrombin binden, das Thrombinmolekül zu beeinflussen (*Bock, 1992; Griffin, 1993*).

### 1.2.5 Fibrinolyse

Eine ungehindert fortschreitende Gerinnung würde einen Verschluss (Thrombose) des Gefäßes oder eine Thrombenverschleppung (Embolie) als Folge haben. Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es vermutlich konstant zu kleineren Gerinnungsvorgängen und Fibrinablagerungen. Um einen Blutfluss dennoch gewährleisten zu können, kann das Fibrinolyse-System gebildete Fibringerinnsel wieder auflösen und ein Ausufern der Hämostase durch negative Feedback-Mechanismen und Hemmfaktoren von vornherein unterbunden werden (*Arnout et al., 2006*). Die zentrale Serinprotease der Fibrinolyse ist das Plasmin, welches Fibrin in FDP (Fibrinospaltprodukt) umwandelt und den Thrombus, der durch die Fibrinstränge zusammengehalten wird, zum Zerfall bringt. Bei dieser Spaltung der Fibrin Gamma-Kette entstehen D-Dimere, die eine wichtige Rolle in der Labordiagnostik spielen (*Wada und Sakuragawa, 2008*). Die Aktivierung der Fibrinolyse ist im Wesentlichen weniger komplex als die Gerinnungskaskade. Sie besteht hauptsächlich in der Überführung des inaktiven Plasminogen in das Plasmin.

Endothelzellen sezernieren Aktivatoren und Proaktivatoren der Fibrinolyse, insbesondere tPA (tissue Plasminogenaktivator) und Pro-Urikinase. Die freigesetzte Pro-Urikinase wird durch im Plasma schwimmende Aktivatoren in die Urokinase umgewandelt. Bei diesen Aktivatoren handelt es sich um zwei Faktoren aus der sekundären Hämostase, Faktor XII und Kallikrein. Dass das Kallikrein-Kininsystem sowohl bei der Gerinnungsaktivierung als auch bei der Fibrinolyse am Anfang steht, verdeutlicht, dass sowohl die Entstehung des Thrombus als auch dessen Auflö-

sung ständig parallel ablaufen. Das aktivierte Plasmin bindet an diverse plasminsensitive Schnittstellen (*Rijken und Lijnen, 2009*) der vernetzten Fibrinpolymere und katalysiert die Aufspaltung in lösliche Fibrinpeptide (FDP).

### 1.3 Aptamere

Aptamere sind einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 25 bis 70 Basen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Affinität aus, mit der sie an Moleküle durch Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur binden und die Funktion der Bindungspartner modulieren (*Yan und Levy, 2009*). In ihren Eigenschaften und Fähigkeiten sind Aptamere mit monoklonalen Antikörpern zu vergleichen, bieten darüber hinaus aber noch eine Reihe von Vorteilen, z.B. geringe Kosten und fehlende Immunogenizität, die in Zukunft eine Alternative zu Antikörpern aufzeigen könnten (*Levy-Nissenbaum et al., 2008*). Als mögliche Bindungspartner kommen Aminosäuren, Proteine, niedermolekulare Stoffe, Peptide, organische Moleküle und Viruspartikel in Betracht (*Shaman et al. 2008*). Die gezielte Beeinflussung und hochspezifische Bindung an diese unterschiedlichsten Zielmoleküle kommt durch die dreidimensionale Anlagerung, unter Bildung von Helices, Tripel-Helices und Haarnadelschleifen, der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen zustande. Zusätzlich zu der hohen Variabilität und der hohen Selektivität der Zielmoleküle (so können sogar Isoenzyme differenziert werden (*Takemura et al., 2006*)) binden Aptamere mit einer hohen Affinität, die im pico- bis nanomolaren Bereich liegt (*Proske et al., 2005*).

Hergestellt werden Aptamere chemisch, *in vitro*, mit einem Verfahren Namens SELEX (selection of ligands by exponential enrichment), welches 1990 zum ersten Mal beschrieben wurde (*Ellington und Szostak, 1990; Tuerk und Gold, 1990*). Anwendung finden die Oligonukleotide zur Zeit in der Therapie der feuchten altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) in Form des VEGF-Inaktivators Pegaptamib sodium injection (Macugen<sup>®</sup>), in der Diagnostik, in Aufreinigungsprozessen, in der Separation und in der Funktionsanalytik (*Famulok und Mayer 2007; Yan und Levy, 2009*). Für die Herstellung der Aptamere wird keine kostenreiche und zeitaufwendige Zucht von Labortieren oder Zellkulturen benötigt, wie es bei der Produktion von Antikörpern der Fall ist. Dies spiegelt sich in einem deutlichen Kostenvorteil gegenüber Antikörpern wieder (*Ng et al., 2006*).

Ein weiterer Vorzug gegenüber Antikörpern ist die Möglichkeit, mittels Antisense-Technologie

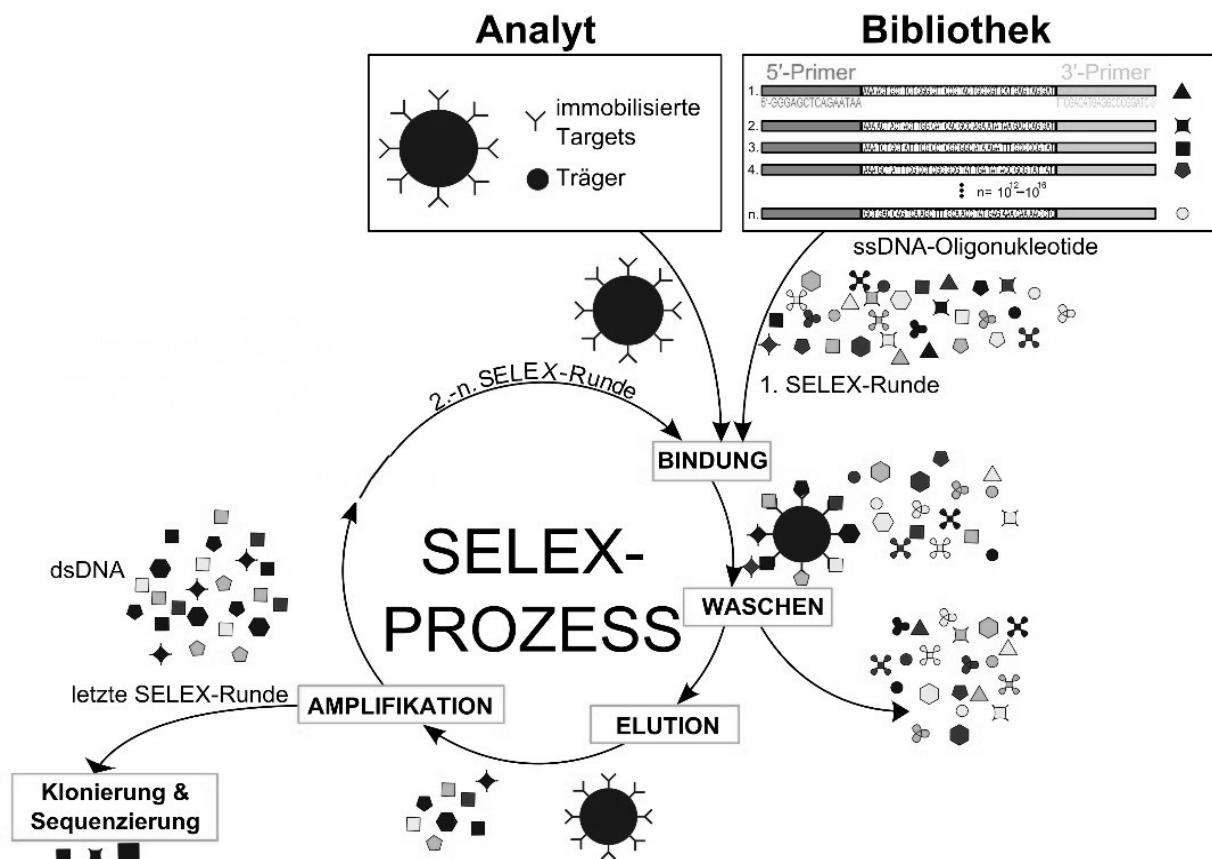


die Wirkung der Aptamere zu antagonisieren (*Alvarez-Salas, 2008*). In dem Fall, dass zum Beispiel ein antikoagulierter Patient einer operativen Therapie unterzogen werden muss, kann innerhalb kurzer Zeit die antikoagulatorische Wirkung der Aptamere aufgehoben werden. Das macht die Aptamere zu einem gut steuerbaren Medikament (*Famulok und Mayer, 2007*).

### 1.3.1 SELEX-Verfahren und Modifizierung von Aptameren

Die Produktion der Aptamere geschieht vereinfacht beschrieben in drei Teilschritten nach der Methode der *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX): Selektion, Separation und Amplifikation (*Yan und Levy, 2009*). Eine schematische Darstellung des SELEX Verfahrens findet sich in Abb. 3.

Ausgangspunkt des SELEX Verfahrens ist eine einzelsträngige RNA- oder DNA-Bibliothek, die aus Oligonukleotiden in randomisierter Basenfolgen besteht. Die Oligonukleotide bestehen aus zwei konstanten Abschnitten am 5'-Ende und am 3'-Ende, welche als Primerregionen für die PCR dienen (*Beaudry und Joyce, 1992*) und einem zwischen den konstanten Regionen liegenden randomisierten Abschnitt, der zwischen 20 und 220 Nukleotide enthält (*Bartel und Szostak, 1993*). Diese einmalig hohe Variabilität der Oligonukleotidbibliothek erreicht theoretisch bis zu  $10^{15}$  verschiedenen Sequenzen (*Yan und Levy, 2009*).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Selex Verfahrens**

Aus einer chemisch synthetisierten ssDNA-Bibliothek werden über den wiederholten, zyklischen Prozess von Bindung an das Zielmolekül, Entfernung der nicht bindenden Spezies und Amplifikation der eluierten, targetspezifischen Spezies affine DNA-Moleküle angereichert.

Modifiziert nach Quelle: [www.commons.wikimedia.org](http://www.commons.wikimedia.org)

## 1. Die Selektion

Im ersten Schritt wird ein Molekül, für das ein passendes Aptamer gefunden werden soll, mit der Oligonukleotid-Bibliothek inkubiert. Die größte Zahl der Oligonukleotiden kann nicht an das Molekül binden, nur eine geringe Anzahl besitzt eine ausreichende Affinität, um eine Bindung mit dem Molekül einzugehen.

## 2. Die Separation

Im zweiten Schritt werden die Oligonukleotiden, die frei sind, von den gebundenen, welche an das Zielmolekül gebunden und somit für den weiteren Prozess relevant sind, getrennt.

### 3. Die Amplifikation

Im dritten Schritt wird das Zielmolekül von den Aptameren getrennt und letztere über ein PCR-Verfahren amplifiziert. Die Primerregionen am 5'- und 3'-Ende dienen hier als Ansatzstelle. Im Fall eines RNA-Stranges wird zuerst die RNA mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch die Vervielfältigung aller Oligonukleotide, die eine Affinität und Bindungsfähigkeit an das Zielmolekül besitzen, entsteht ein neuer Pool, der sich im Vergleich zu der Ausgangsbibliothek durch einen verbesserten Bindungscharakter auszeichnet.

Eine Wiederholung des Zyklus ist zwischen 6- und 20-mal erforderlich und führt im Falle eines Erfolges zu einem spezifisch bindenden Oligonukleotid mit einer Dissoziationskonstante im mittleren sub-nanomolaren Bereich (*Famulok und Mayer, 2007*).

Nachdem sich ein Aptamer durch eine hohe Affinität und Spezifität herauskristallisiert hat, werden die nicht an der Bindung beteiligten Regionen von diesem abgetrennt und das Molekül kann am 5'-Ende bzw. 3'-Ende modifiziert und stabilisiert werden. So kann eine verbesserte Resistenz gegen DNAsen im Blut erzeugt werden, ohne dass die Funktion und Affinität der Aptamere verloren geht (*Mayer et al., 2007*).

Die Spaltung der Aptamere im Blut durch Nukleasen ist nicht der einzige limitierende Faktor für die biologische Halbwertszeit. Die Metabolisierung und die Exkretion der Aptamere erfolgt (auf Grund ihrer kleinen Größe von 5-25 kD) nephrogen, so dass die biologische Halbwertszeit gerade einmal 3-5 Minuten beträgt. Diese Halbwertszeit ist jedoch sehr kurz, deshalb besteht die Möglichkeit Ankerproteine anzuheften. Als Ankerproteine können beispielsweise Cholesterin oder PEG (Polyethylenglykol) dienen (*Rusconi et al., 2004*).

#### 1.3.2 Aptamere gegen Thrombin

1992 beschrieben Bock et al. ein Aptamer mit antikoagulatorischer Wirkung: **HD1** (5'GGTTGGTGTGGTTGG-3'). Hierbei handelt es sich um ein aus 15 Basen bestehendes DNA-Aptamer, welches in der Lage ist, gezielt an alpha-Thrombin zu binden und spezifisch dessen proagulatorische Funktion zu inhibieren (*Bock, 1992; Griffin, 1993*). Die Inhibition geschieht über die Ausbildung einer stabilen G-Quadruplex-Struktur des Aptamers und der Anlagerung an

die **Exosite 1** des Thrombins über einen sogenannten T-loop (*Macaya, 1993*). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HD1 auch mit ähnlicher Affinität an Prothrombin bindet und so die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin hemmt (*Kretz, 2006*). In einer Phase-1-Studie der Firmen Archemix und Nuvelo ist diese antikoagulatorische Wirkung untersucht und bestätigt worden, jedoch zeigten die hohen Konzentrationen an benötigten Aptameren ein suboptimales Dosierungsprofil (*Schwienenhorst, 2006*).

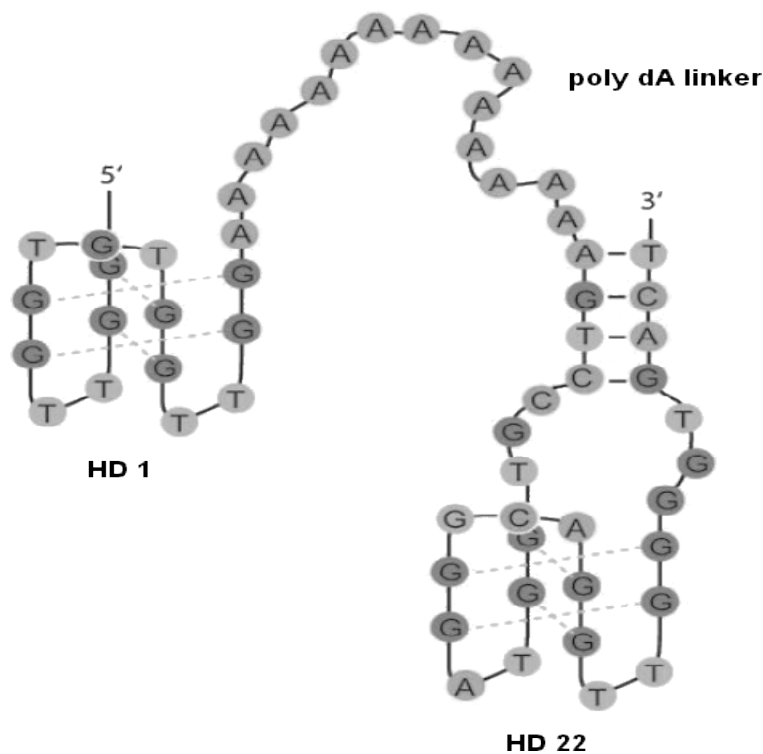
1997 beschrieben Tasset et al. ein weiteres Aptamer, welches an Thrombin bindet: **HD22** (5'GTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'). Dieses Aptamer bindet an die elektropositive **Exosite 2** des Thrombins. Es besitzt im Vergleich zu HD1 eine höhere Affinität, aber auf Grund der Bindungspartner der unterschiedlichen Exosites (siehe Kapitel 1.2.2.) ist es nur in der Lage, moderate Effekte bei der Blockierung der Fibrinbildung hervorzurufen. Jedoch konnte eine Inhibition der Thrombin-vermittelten Plättchenaktivierung und der Aktivierung der Faktoren V und VIII, die auch über die Exosite 2 vermittelt werden, bewiesen werden (*Tasset, 1997*).

### 1.3.3 Fusionsaptamere

Aus dem Gebiet der Antikörperforschung ist die Idee bekannt, dass multivalente Antikörper zu einer höheren Affinität und Selektivität gegenüber ihren Zielmolekülen fähig sind (*Adams, 1999; Neri, 1995; Viti, 1999*). Multivalent bedeutet in diesem Fall, dass ein Antikörper mehrere Bindungsmöglichkeiten für Zielmoleküle hat, unter Umständen auch unterschiedliche Oberflächenstrukturen erkennen kann (multidomain targeting). Da es sich bei Aptameren um DNA- oder RNA- Einzelstränge handelt, ist eine Verknüpfung der beiden Aptamere HD1 und HD22 über unterschiedliche Linker-Nukleotide leicht möglich. Somit eröffnet sich ein Weg, die Aptamere in ihrer Affinität und Spezifität deutlich zu erhöhen, wenn das SELEX- Verfahren ab einem bestimmten Zeitpunkt keine signifikanten Optimierungen mehr ermöglicht.

Basierend auf dieser Theorie wurde (wie in Abbildung 4 zu sehen ist) ein bivalentes Fusionsaptamer, bestehend aus HD1 und HD22, verbunden über eine poly-dA-linker mit dem Namen **HD1-22**, hergestellt (*Müller et al., 2007*):

(5'GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3')



**Abb. 4:** Der Aminosäureaufbau des Fusionsaptamers HD1-22. HD1 ist am 5'Ende lokalisiert und über einen poly dA linker mit HD22 verbunden. Thymidin ist mit T abgekürzt, Cytidin mit C, Adenosine mit A und Guanodin mit G. Quelle: Müller J, Wulffen B, Pötzsch B, Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chembiochem.* 2007; 8: 2223-2226

Das Ziel dieser Fusion bestand darin, die Affinität des Aptamers zu steigern und durch die simultane Bindung an beide Exosites die proagulatorische Funktion des Thrombins effizienter zu inhibieren. Mit Hilfe der surface plasmon resonance (SPR) konnte das Bindungsverhalten der Aptamere dargestellt werden. Es wurde deutlich, dass HD1-22, im Vergleich zu HD1, eine zehnmal höhere Bindungsaffinität an Thrombin aufweist, während eine vierfach gesteigerte Bindungsaktivität im Vergleich zu HD22 vorlag. In unterschiedlichen funktionalen Tests zeigte sich die Überlegenheit von HD1-22 in der Beeinflussung der Thrombinaktivität (Müller *et al.*, 2008). Andere Forschungsgruppen bestätigen die Eigenschaften des Fusionsaptameres, auch wenn sie poly-dT-linker verwendeten, was die Eigenschaften des Fusionsaptamers aber nicht signifikant veränderte (Hasegawa *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008).

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Thrombin, als das zentrale Molekül der Gerinnungskaskade, ist nicht nur für die Spaltung von Fibrinogen zuständig, sondern es steht auch mit vielen anderen Faktoren in Interaktion, die pro- und antikoagulatorisch wirken, aber auch in das inflammatorische- und Wundheilungsgeschehen eingreifen (*Coughlin, 2005*).

Diese zentrale Rolle macht auch verständlich, dass in der antikoagulatorischen Therapie eine Reihe von Medikamenten (z.B. Bivalirudin und Argatroban) gezielt Thrombin blockieren, um die Blutgerinnung zu inhibieren (*Warkentin, 2004*).

Mit der Entwicklung der Aptamere HD1 und HD22 ist es gelungen, antikoagulatorisch wirksame Moleküle zu schaffen, welche selektiv an die Hauptbindungsstellen des Thrombinmoleküls binden (Exosite 1 und 2) und diese blockieren (*Bock, 1992; Müller et al., 2007; Tasset, 1997*). Diese Eigenschaften qualifizieren die untersuchten Aptamere als potentielle Antikoagulanzen. Die Entwicklung eines Fusionsaptamers (HD1-22), welches die beiden Aptamere HD1 und HD22 über einen poly-A-linker verbindet, erzeugte ein Aptamer mit einer besseren Bindungsfähigkeit und einem stärkeren Inhibitions Potenzial (*Müller et al., 2008*). Die alleinige Kenntnis über die Inaktivierung des Thrombinmoleküls durch die drei Aptamere (HD1, HD22 und HD1-22) ist jedoch, wenn man die Komplexität des Gerinnungssystems und die vernetzte Funktion des Thrombins in sowohl pro- als auch antikoagulatorische Abläufe bedenkt, nicht ausreichend. Da die Wirkung der Aptamere sich nicht durch eine komplette Inhibition des Thrombinmoleküls auszeichnet (wie in Falle des Hirudin), sondern mit der selektiven Blockierung der einzelnen Exosites nur einzelne Funktionen des Thrombins gehemmt werden, ist eine Untersuchung der einzelnen Bindungspartner und die Wirkung der Aptamere auf diese Bindung von großer Bedeutung, um das Potenzial der Aptamere vollständig zu verstehen und ausnutzen zu können.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, den Effekt der drei vorstehend beschriebenen Thrombin-Aptamere auf die Bindung der verschiedenen Reaktionspartner des Thrombins zu verstehen, um so eine genauere Charakterisierung der Aptamerwirkung auf die gesamte Blutgerinnung zu ermöglichen. Als Bindungspartner des Thrombins wurden AT, Heparin und Thrombomodulin untersucht.

Durch die selektive Blockade der Exosites am Thrombinmolekül durch HD1 und HD22 war es außerdem möglich, die Funktionen der beiden Exosites auf die Konformationsänderungen innerhalb des Thrombinmoleküls zu untersuchen. Zu erwarten war also, dass HD 1 und HD 22 nur die Bindungspartner blockieren können, die auch an die gleiche Exosite binden. HD 1 dürfte also nur

Thrombomodulin (welches ebenfalls an die Exosite 1 bindet) blockieren, und HD 22 nur AT und Heparin (an Exosite 2 bindend).

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe im zeitlichen Verlauf unter physiologischen Bedingungen im Blutplasma.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien

##### **Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg**

Aqua dest. Ampuwa<sup>®</sup>

##### **KMF Laborchemie, Lohmar**

Natronlauge 1 mol/l (NaOH)

Salzsäure 1 mol/l HCL

##### **Merck GmbH, Darmstadt**

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

Magnesiumchlorid- Dihydrat ( $\text{MgCl}_2$ )

Natriumchlorid (NaCl)

##### **Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen**

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

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

##### **Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen**

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

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

#### 2.1.2 Verwendete Reagenzien

##### **Bachem, Weil am Rhein, Germany**

Fluorogenes Peptidsubstrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC



**Branch Pentapharm, Basel, Schweiz**

Refakit Reptilase

**Enzygnost TAT micro der Firma Siemens Healthcare Diagnostics**

Probenpufferlösung: Tris-Pufferlösung (100mmol/l), Tween (10ml/l), EDTA (37g/l)

Wachlösung: Tweenhaltige Phosphatpufferlösung

Substratpuffer: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Citrat-Pufferlösung

Chromogen POD: o-Phenylendiamin-dihydrochlorid

Schwefelsäure 0,5 N

Anti-Human-AT III, Peroxidase konjugiert

**In-house Produktion, Hämatologie und Transfusionmedizin Bonn**

Poolplasma (gepooltes Citratplasma, hergestellt aus 4 entsprechend antikoagulierten Vollblutspenden)

**Roche GmbH, Mannheim**

Liquemin® 5000 Einheiten/ml

**Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany**

BM Chemiluminiscence ELISA Substrat

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen**

Tween 20

Bovine Serum Albumin, min 90 % (BSA)

**Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande**

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

Thrombin Calibrator

**Verwendete Pufferlösungen****Tris-Puffer:**

10 mM Tris  
50 mM NaCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 % Tween 20  
pH = 8,0

**PBS-Puffer:**

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
9,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH = 7,4

**TBS Puffer:**

10 mM Tris  
1 m M MgCl<sub>2</sub>  
140 mM NaCl  
5 mM CaCl  
0,1 % BSA  
10 µ PL  
pH = 7,4

**Fluo-Puffer:**

20 mM Hepes  
6 % BSA (60 mg/ml)  
pH = 7,35

## 2.1.3 Verwendete Materialien

**Eppendorf GmbH, Hamburg**

Reaktionsgefäße, verschieden Größen

**Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden**

Flouornunc 96-well-Mikrotiterplatten (weiß)

#### 2.1.4 Verwendete Geräte

**BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall**

Plattenfluorometer FLX 800

**Cenco instrumenten B.V., Breda, Niederlande**

Vortex Gerät

**Eppendorf GmbH, Hamburg**

Centrifuge 5804

**Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel**

Wasserbad

**Gilson, Ohio, USA**

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

**Methrom Deutsche GmbH & CO, Filderstadt**

PH-Meter 744

**Mettler Toledo GmbH, Giessen**

Digitalwaage (Modell PL 1200)

**Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden**

Plattenfluorometer FlouroScan

**SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim**

Tecan SLT-washer für Mikrotiterplatten

## 2.2 Methodik

Der experimentelle Teil gliedert sich in zwei Abschnitte: In der ersten Versuchsserie wurde die Aptamerwirkung auf die Interaktion zwischen Antithrombin / Heparin und Thrombin untersucht, während im zweiten Teil die Wirkung der Aptamere auf das Protein-C System im Vordergrund stand.

Die Untersuchung der Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe erfolgte jeweils in Abhängigkeit von den Bindungspartnern des Thrombins (Antithrombin und Thrombomodulin).

Alle Konzentrationsangaben in dieser Arbeit werden in finaler Konzentration angegeben, beziehen sich also auf die Konzentration in dem Volumen des kompletten Testansatzes, nach Zugabe aller Bestandteile des Testansatzes.

### 2.2.1 Bestimmung der amidolytische Aktivität des Thrombins

#### **Versuchsprinzip**

Mit Hilfe eines synthetischen Peptidsubstrats, welches durch Thrombin gespalten wird, ist es möglich, die amidolytische Aktivität des Thrombins zu bestimmen. Der Umsatz eines fluorogenen Peptidsubstrats kann mit Hilfe eines Plattenfluorimeters gemessen werden. Wichtig für dieses Testsystem ist die Tatsache, dass die amidolytische Aktivität des Thrombins gegenüber kleinen Peptidsubstraten durch die Aptamere nicht blockiert wird (*Müller et al., 2008*). Das Substrat ist ein kurzkettiges Peptid, welches aus drei Aminosäuren (AS) besteht und mit einem Indikator verbunden ist. Der Indikator ist in diesem Falle die flourogene Gruppe 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC), verbunden mit der Struktur: Z-Gly-Gly-Arg-AMC. Die Aminosäuren sind verantwortlich für die Spezifität gegenüber dem Zielprotein. Nachdem das Substrat proteolytisch durch Thrombin gespalten wurde, kommt es zu der Freisetzung des Indikators, der fluorometrisch mit Licht einer Wellenlänge von  $\lambda = 360$  nm angeregt und dann mit einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 460$  nm gemessen wird. Die Fluoreszenzemission pro Zeiteinheit ist im Falle eines Substratüberschusses proportional zur vorhandenen Menge an aktivem Thrombin. Gemessen wurde, gemäß der apparativen Gegebenheiten, mit dem Plattenfluorimeter FlouroScan über einem Zeitraum von 60 Minuten (alle 30 Sekunden). Die Messung der Thrombinaktivität fand in 96-well-Mikrotitrierplatten (MTP) statt.

## Durchführung

Der Einfluss der Aptamere auf die amidolytische Thrombinaktivität wurde in TBS Puffer in Kombination mit 5 mM CaCl und 10  $\mu$ M PL untersucht. Der Puffer wurde verwendet, um eine halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 500 nM herzustellen. Diesem Ansatz wurde Thrombin hinzugefügt, in einer Konzentration, so dass im finalen Volumen (nach Zugabe des Substrates) eine Konzentration von 90 ng/ml bestand. Der Ansatz inkubierte 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann in einem Volumen von jeweils 100  $\mu$ l auf eine MTP übertragen. Die Zugabe von 100  $\mu$ l Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC in einer Konzentration von 500  $\mu$ M, verdünnt in TBS Puffer, startete die Reaktion, die im Fluorometer eine Stunde lang kinetisch gemessen wurde. Es wurden generell mindestens Doppelwerte bestimmt.

### 2.2.2 Antithrombin im gereinigtem System

In den Experimenten zur Untersuchung der Inhibition von Thrombin durch Antithrombin und Heparin wurde jeweils 50  $\mu$ l Thrombin, in TBS Puffer, in einer finalen Konzentration von 90 ng/ml in insgesamt 36 Positionen der Mikrotiterplatte (MTP) vorgelegt. Jeweils 50  $\mu$ l Heparin wurden nun auf die 36 Positionen verteilt, wobei die Heparinkonzentration mit jeder Spalte halb-logarithmisch abnahm (beginnend mit 0,25U/ml). Ein Gemisch (100  $\mu$ l) aus AT (auch hier wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe in TBS Puffer, beginnend mit 0,5 U/ml AT, angelegt). Anschließend wurde das Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC, in einer finalen Konzentration von 100 mM, mit einer 8-Kanalpipette in alle Positionen pipettiert. Die Zugabe des Substrates startet das Experiment und die amidolytische Thrombinaktivität wurde eine Stunde im Plattenfluorometer gemessen.

Die Darstellung der konzentrationsabhängigen Aptamerwirkung auf die Inhibition von Thrombin durch AT (und Heparin) wurde die Verdünnungsreihe der Aptamere und die Platzierung auf der MTP wie folgt angeordnet: In 8 Eppendorfcups wurde die halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe (beginnen mit 1000 nM) durchgeführt, so dass in jedem Cup ein Volumen von 16,7  $\mu$ l vorlag. Hier hinein wurde das Gemisch aus Thrombin (90 ng/ml) und bei den Heparinversuchen zusätzlich Heparin (0,005 U/ml) mit einem Volumen von insgesamt 233  $\mu$ l gegeben. Dieses Gemisch inkubierte bei Raumtemperatur für 5 Minuten, so dass die Aptamere Komplexe mit dem Thrombin eingehen konnten. Die Inkubationsdauer von 5 Minuten wurde auf Basis der Ergebnis-

se aus dem SPR Versuchen und der ermittelten on-rate gewählt (*Müller et al., 2008*). Danach wurde jeweils 100  $\mu$ l aus der Eppendorfcups auf die MTP übertragen. Zum Start der Reaktion erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Substrat (in TBS Puffer verdünnt) Z-Gly-Gly-Arg-AMC (100 mM) und AT (ohne die Anwesenheit von Heparin 0,5 U/ml AT und in Kombination mit Heparin nur 0,016 U/ml AT). Die Konzentrationen beziehen sich auf die finalen Volumina.

Diese Experimente wurden jeweils mit und ohne Phospholipide (PL) durchgeführt, um den Einfluss der PL auf die Aptamerwirkung dazustellen. Die PL dienen als Matrix für die durch Calcium vermittelte Verbindung der Gerinnungsfaktoren und ist in mehreren Schritten der Kaskade von entscheidender Bedeutung (*Ruf et al., 1991; Thomas, 2002*). Daher war eine weitere Fragestellung, die sich im Laufe der Arbeit entwickelte, ob die PL die Wirkung der Aptamere verändern (Siehe dazu Kapitel 3.2.2).

Die Untersuchung der zeitlichen Aspekte der Aptamerwirkung auf den Schutz Thrombins vor der Inhibition durch AT konnte mit folgendem Versuchsaufbau durchgeführt werden:

In eine MTP wurde in jede Position 50  $\mu$ l TBS Puffer mit 5 mM CaCl und 10  $\mu$ M PI gegeben. Hierzu werden 25  $\mu$ l Thrombin in einer finalen Konzentration von 90 ng/ml pipetiert. In den Aptameransatz (eine Spalte) wurden 60 nM (finale Konzentration) Aptamere (25  $\mu$ l) und in die Leerwerte (zweite Spalte) 25  $\mu$ l TBS Puffer hinzugefügt. Es wurde eine Aptamerkonzentration von 60 nM gewählt, da hier eine eindeutige Wirkung der Aptamere auf die Thrombin-AT-Interaktion zu sehen war (siehe Abb. 8) Durch diesen Aufbau ist es möglich, den Aptamereinfluss zu jedem Zeitpunkt mit dem entsprechenden Leerwert zu vergleichen und so einen Unterschied in der Thrombinaktivität darzustellen, welche auf den Schutz der Aptamere vor AT zurückzuführen wäre. Es folgt die simultane Zugabe von 50  $\mu$ l AT (finale Konzentration 1 U/ml) nach einem Zeitschema in zwei Positionen, jeweils im Aptameransatz und im Leerwert. So ergab sich eine Inkubationszeit zwischen Aptameren, Thrombin und Antithrombin in der ersten Reihe der MTP von 20 Minuten und in der letzten Reihe von 0 Minuten. Das Zeitschema der AT Zugabe betrug: 0; 5; 10; 12; 15; 18; 19; 20 (min). Nach insgesamt 20 Minuten, beginnend mit der ersten AT Zugabe, wurde simultan in allen Positionen die Reaktion durch die Zugabe von 50  $\mu$ l (in TBS Puffer gelöstes) Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC (500  $\mu$ M finale Konzentration), mittels einer 8 Kanalplatte gestartet.

### 2.2.3 Antithrombin im Plasma

#### 2.2.3.1 Herstellung von defibrinisiertem Plasma

Verwendet wurde gepooltes Citratplasma (In-house Produktion, Institut für Exp. Hämatologie und Transfusionsmedizin). Damit die funktionellen Experimente im Poolplasma (TGA, siehe Punkt 2.2.3.2) mit der strukturellen Untersuchung im TAT-ELISA zu vergleichen sind, musste das Poolplasma defibrinisiert werden, da die Fibrinbildung eine Messung der TAT-Komplexe unmöglich machen würde.

Zur Herstellung von defibrinisiertem Plasma wurden 900 µl Poolplasma mit 100 µl Pefakit Reptilase Time der Firma Pentapharm gemischt, 5 Minuten bei RT inkubiert und dann 3 min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der fibrinfreie Überstand wurde abpipetiert und erneut 3 min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Dieser fibrinfreie Überstand konnte nun für die Experimente verwendet werden.

#### 2.2.3.2 Thrombingenerierungs-Assay (TGA)

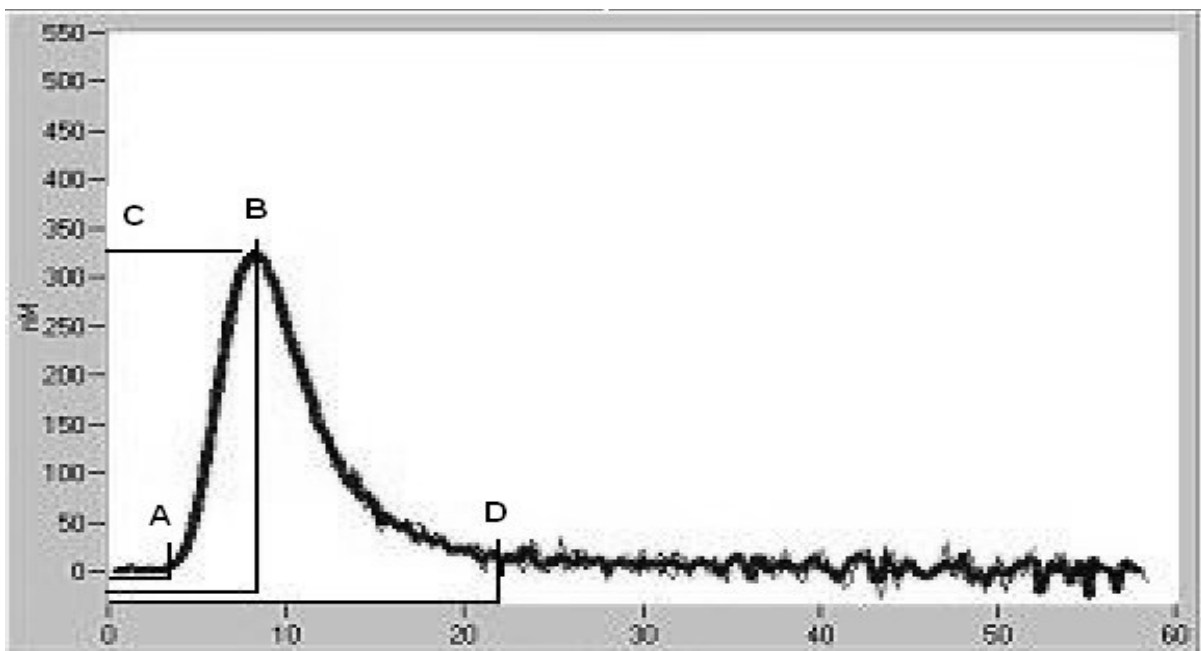
##### **Versuchsprinzip**

Der Thrombingenerierungs-Assay dient unter anderem zur Bestimmung des endogenen Thrombinbildungspotentials (ETP) in einer Citratplasmaprobe (Poolplasma). Durchgeführt wird der Assay in einem Plattenfluorometer (FlouroScan) und anschließend ausgewertet mit der *Thrombinoscope<sup>TM</sup> Software*. Dieser Test findet in der Routinediagnostik Bedeutung in der Abschätzung des Blutungs- oder Thromboserisikos, zur Messung einer Antikoagulantientherapie oder einer Substitutionstherapie mit Faktorenkonzentraten. In diesem Versuchsansatz wird Citratplasma mit einem aus Phospholipiden (4 µM) und Tissue Factor (5 pM) bestehendem Reagenz (PPP-Reagenz) verwendet, welches parallel zu einem Calibratoransatz auf der gleichen 96-well-Platte, Mikrotiterplatte (MTP), angesetzt wird. Dieser Calibrator besteht aus einem Gemisch aus Citratplasma und Thrombin-Calibrator (alpha 2M-Thrombin).

Die Gerinnungskaskade und somit die Thrombingenerierung kann durch die Zugabe eines Gemisches aus CaCl<sub>2</sub> und einem thrombinspezifischen fluorogenen Substrat über den exogenen Aktivierungsweg ausgelöst werden. Die Funktion der Calibratoransätze ist es, die gemessenen Werte aus den unterschiedlichen Plasmaproben in Bezug zu dem „inner-filter“ Effekt, den Fluoreszenzcharakter und den Substranzverbrauch zu normalisieren, da in den Proben im Calibratoransatz

das Peptidsubstrat konstant umgesetzt wird. Dadurch ist eine Vergleich zwischen unterschiedlichen Messungen möglich. Die amidolytische Aktivität des entstandenen Thrombins wird gemessen anhand der Kinetik der Spaltung des fluorogenen Peptidsubstrates.

Die Kinetik des Substratumsatzes wird in einem Plattenfluorometer bestimmt und im Folgenden mit Hilfe der *Thrombinoscope<sup>TM</sup> Software* berechnet (siehe Abb. 5). Mit diesem Verfahren kann man die absolute Thrombinentstehung bestimmen. Die Messparameter, die automatisch durch die *Thrombinoscope<sup>TM</sup> Software* berechnet werden, sind: der **peak** der Messung (höchster Thrombinwert), die **time to peak** (Zeit bis zum peak), die **lagtime** (Zeit bis zum Beginn der Thrombin-generierung), die **start tail** (Zeit bis zum Abfall des Signals auf 0) und das **ETP**, das endogene Thrombinbildungspotential (ergibt sich aus der Fläche unter der Kurve). Dieser Wert gibt Auskunft über die absolute Menge an Thrombin, welches im Verlaufe des Versuches aktiviert wird.



**Abb. 5:** Beispielgraph einer TGA-Messung. Durchgeführt im Fluoroscan und graphisch ausgewertet mit der *Thrombinoscope<sup>TM</sup> Software*. Eingezeichnet sind die relevanten Parameter: A) lagtime; B) tpeak; C) peak; D) start tail; Das ETP entspricht der Fläche unter dem Graphen.

## Durchführung

Gemäß den Vorgaben des Herstellers (Thrombinoscope B.V.) wurden für die Durchführung des Versuches jeweils 20 µl PPP-Reagenz für den Testansatz und 20 µl Thrombin Calibrator für den Kalibrationsansatz in die Vertiefungen einer 96-well-Platte (MTP) pipetiert. Anschließend wer-



den 80 µl des Plasmas zu den Test- und Kalibratoransätzen zugefügt. Bis zum Start des Versuches wurde die MTP in der auf 37°C vorgewärmten Messkammer des Fluorometers inkubiert. Das Gerät musste vor Zugabe des Startreagenz, welches durch das Fluorometer automatisch geschieht, mit der ebenfalls auf 37°C vorgewärmten Washing Solution (100 mM CaCl<sub>2</sub>) gespült werden. Anschließend wird die Washing Solution in mehreren Schritten aus dem Fluorometer entfernt und die FluCa-Lösung eingefüllt. Diese Lösung beinhaltet 1225 µl Fluo Buffer, 140 µl CaCl (1 M) und 35 µl fluorogenic substrate (2,7 mM). Daraus ergibt sich im finalen Testansatz eine Konzentration von 0,16 M CaCl und 45 µM fluorogenic substrate. Mit einem gesamt Volumen von 1400 µl musste diese Lösung vor jedem Experiment neu angesetzt und vorgewärmt werden, dabei musste das in DMSO gelöste florogene Substrat erst kurz vor Beginn der Messung mit den anderen Reagenzien vermischt werden. Durch den Start der Messung wird über einen Dispenser jeweils 20 µl FluCa Lösung in die Vertiefungen hinzugegeben. Auf Grund der apparativen Vorraussetzungen findet die Messungen alle 20 Sekunden in den befüllten Vertiefungen der MTP statt.

Für die Durchführung des Thrombingenerierungs-Assays wurde in defibrinisiertem Plasma jeweils eine halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe aller Aptamere angesetzt (mit einer maximalen Aptamerkonzentration von 666 nM), bevor das Plasma, gemäß den vorstehend beschriebenen Angaben, dem Testsystem zugeführt wurde.

### 2.2.3.3 Bestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT-ELISA)

Als Nachweis, dass die Aptamere die AT-Thrombin-Komplexbindung inhibieren können, sollte mit Hilfe des TAT-ELISAs ein Testsystem verwendet werden, welches eine strukturelle Analyse der TAT-Bindung ermöglichte. Hierzu wurden aus den vorhergehenden TGA-Experimenten einige charakteristische Zeiten verwendet, um für diese Zeitpunkte die TAT-Komplexe zu ermitteln. Die Probenzusammensetzung ist identisch mit dem TGA-Experimentenaufbau, es wurde lediglich Hirudin und NaCitrat verwendet, um die AT-Thrombin-Komplexbildung und Thrombingenerierung zu stoppen.

### **Prinzip des angewandten TAT-ELISAs**

Die proagulatorischen Eigenschaften des Thrombins werden unter physiologischen Gegebenheiten durch Antithrombin inaktiviert. Die Bindung dieser Komplexe ist irreversibel, kann daher gut

gemessen werden und ist ein guter Biomarker für die Bildung und die daraus resultierende Inaktivierung des Thrombins.

Verwendet wurde der Enzygnost TAT micro der Firma Siemens Healthcare Diagnostics, ausgewertet wurde der Test durch den MRX-Reader von Dynatech Laboratories. Das Prinzip der Methode beruht auf einem Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip zur in-vitro Bestimmung des Human-Thombin/Antithrombin-Komplexes. In der klinischen Routinediagnostik hat dieser Test lediglich eine untergeordnete Rolle, er wird aber in der Grundlagenforschung und in klinischen Studien verwendet.

Zuerst bindet der in der Probe vorhandene TAT-Komplex an die gegen Thrombin gerichteten Antikörper, die auf der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach dreimaligem Waschen mittels Tecan SLT Washer werden in einer zweiten Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen humanes AT an die freien AT Determinanten gebunden. Es folgt erneut eine Inkubation, nach der die überzähligen enzym-konjugierten Antikörper wieder abgewaschen werden. Im nächsten Schritt folgt die enzymatische Umsetzung eines Substrates OPD/Wasserstoffperoxid, welche durch den Zusatz von verdünnter Schwefelsäure nach 30 Minuten unterbrochen wird. Die der Konzentration von TAT proportionale Farbintensität wird photometrisch bestimmt. Ermittelt wurde die TAT-Konzentration bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 490$  nm mit einer Referenzwellenlänge von  $\lambda = 630$  nm. Die ermittelten Werte wurden an der zu jedem Test erstellten Standardkurve abgelesen und vom MRX-Reader automatisch in ng/ml ausgegeben. Der Konzentrationsbereich von 2 bis 60 ng/l wird durch Standards abgedeckt. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe mit Konjugat-Puffer verdünnt werden.

## **Durchführung**

In den Experimenten zur Bestimmung der TAT-Komplexe wurde 20  $\mu$ l PPP-Reagenz in die Vertiefung der MTP Platte gegeben, dann folgten 80  $\mu$ l defibrinisertes Plasma mit einer finalen Aptamerkonzentration von 666 nM. Diese Konzentration wurde gewählt, weil hier in den TGA Experimenten eine eindeutige Wirkung der Aptamere zu erwarten ist (vgl. Kapitel 3.2.4.1). Die Reaktion wurde mit der manuellen Zugabe von FluCa-Lösung gestartet und mit der Zugabe von 8  $\mu$ l NaCitrat pro Vertiefung (um eine finale Konzentration von 20 mM zu erreichen) und 6  $\mu$ l Hirudin (um eine finale Konzentration von 50  $\mu$ g/ml zu erzielen) zu den speziellen Zeitpunkten gestoppt. NaCitrat unterbindet die Neubildung von Thrombin und Hirudin blockiert irreversibel

das freie Thrombin und verhindert eine weitere Bildung von AT-Thrombin-Komplexen (*Greina-cher und Warkentin, 2008*). Im Fall des Zeitpunktes 0 min wurde zuerst NaCitrat und Hirudin dem Plasma zugegeben und dann die FluCa-Lösung. Das Zeitschema orientierte sich nach dem typischen Verlauf im Thrombingenerierungs-Assay und wird im Ergebnissteil genau beschrieben. In jedem Ansatz befanden sich:

- 20 µl PPP-Reagenz
- +80 µl defibrinisiertes Plasma mit 666 nM  
finaler Aptamerkonzentration
- +20 µl FluCa-Lösung
- +8 µl NaCitrat (20 nM finale Konzentration)
- +6 µl Hirudin (50 µg/ml finale Konzentration)

Die Proben wurden bei -20°C gelagert und mit Proben-Puffer auf 1:5000 verdünnt, bevor sie für den TAT-ELISA verwendet wurden. Es wurden Doppelwerte bestimmt. Der Ablauf des TAT Elisas beinhaltet die unten beschriebenen Schritte und richtet sich in der Durchführung nach Vor-gaben des Versuchsprotokolls des TAT micro der Firma Siemens Healthcare Diagnostics.

Auf die mit Kaninchen-Antikörper beschichtete Mikrotitrierplatte wurden hinzugegeben:

a) 50 µl Probenpuffer + 50 µl Probe bzw. Standard, Inkubation: 30 min bei 37°C

Entfernung der nicht gebundenen TAT Komplexe im SLT-Washer von Tecan (beinhaltet 3 Waschzyklen)

b) Hinzugabe von 100 µl Konjugatlösung, welche 15 min bei 37°C auf der MTP inkubiert  
erneuter Waschzyklus

c) Zugabe von 100 µl Substratpuffer, welches 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert

d) Stopp der Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure

Auf Grund der Komplexstabilität und gemäß den Herstellervorgaben musste die Probe innerhalb einer Stunde im MRX-Reader gemessen werden.

## 2.2.4 Aptamerwirkung auf die Thrombomodulin-Thrombinbindung

In folgender Versuchsserie wurde nun die Thrombomodulin-vermittelte Thrombinmodulation und die Beeinflussung dieser Interaktion durch die Aptamere untersucht. Dazu kamen, wie vorstehend für AT beschrieben, zuerst eine Versuchsserie im gereinigtem System und dann ein Thrombingenerierungs-Assay im Plasma zum Einsatz.

### 2.2.4.1 Thrombomodulin-vermittelte Thrombinmodulation im gereinigtem System

Im Folgenden sollen die Fluorometerversuche zur Untersuchung der Beeinflussung der Thrombomodulin-Bindung an Thrombin durch die Aptamere (Kapitel 3.3 Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin im gereinigtem System) beschrieben werden.

#### **Versuchsprinzip**

Im ersten Teil des Thrombomodulinkapitels sollte, so wie in der ersten Versuchsserie die funktionelle Untersuchung der amidolytischen Thrombinaktivität im Fluorometer gemessen wurde, die Aktivität eines Enzyms durch den Umsatz eines fluorogenen Substrates gemessen werden. Im Falle des Thrombomodulins bietet es sich an, den Substratumsatz des APC zu messen, denn Protein C wird nur aktiviert, wenn Thrombin an Thrombomodulin bindet und dieser Komplex dann Protein C aktiviert. Die gemessene APC Aktivität kann also Rückschlüsse über die Bindung zwischen Thrombin und Thrombomodulin geben. Thrombin bindet an Thrombomodulin und aktiviert, in Form eines Komplexes mit PL und  $\text{Ca}^{2+}$ , Protein C zu aktiviertem Protein C (APC). Dieses kann das fluorogene Peptid PEFA 5791 umsetzen und dann im Fluorometer gemessen werden. PEFA 5791 ist ein fluorogenes Peptid-Substrat mit der Formel  $\text{Pyr-Pro-Arg-AMC-AcOH}$  und besitzt eine  $K_m$  von 0,56 mM. In den folgenden Experimenten wurde also die Aktivität des APC gemessen, welche proportional zur Effektivität der Bindung von Thrombin an Thrombomodulin ist. Da Protein C in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen effektiv nur durch Thrombin in Verbindung mit Thrombomodulin aktiviert werden kann (*Esmon, 2004*), können mit den gemessenen Werten jedoch Aussagen über das Bindungsverhalten und die Blockierung der Thrombomodulinbindung durch die Aptamere gemacht werden.

#### **Durchführung**

In dem Experiment, welches den Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an

Thrombomodulin im gereinigtem System untersuchen sollte, wurde zuerst die Wirkung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen ermittelt. Hierzu wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe der Aptamere mit der höchsten Konzentration von 666 nM in 8 Eppendorfcups angelegt, mit einem Volumen von 60  $\mu$ l. In diesem Ansatz befand sich außerdem Thrombin in einer finalen Konzentration von 90 ng/ml. Als Puffer kam TBS Puffer mit 5 mM CaCl und 10  $\mu$ M PL zum Einsatz. In diese Eppendorfcups wurden dann, nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur, 60  $\mu$ l eines Gemisches aus Protein C und Thrombomodulin hinzugegeben, so dass eine finale Konzentration von 0,87 U/ml Protein C und 0,175 U/ml Thrombomodulin erreicht wurde. Der Ansatz wurde gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit aktivierte Thrombin, wenn es nicht durch die Aptamere beeinflusst wird, mit Thrombomodulin zusammen Protein C zu APC. Nach 30 min wurde diese Reaktion gestoppt durch die Zugabe von 10 mM NaCitrat und 50  $\mu$ M Argatra. NaCitrat bindet die freien Calciumionen und verhindert so eine weitere Aktivierung von Protein C. Argatra inhibiert die amidolytische Aktivität des Thrombins, da dieses auch PEFA 5791 umsetzen würde. Aus diesen Eppendorfcups wurden jeweils 50  $\mu$ l in eine MTP pipetiert, mit 50  $\mu$ l des Substrates Pyr-Pro-Arg-AMC-AcOH (50  $\mu$ M finale Konzentration, in TBS Puffer gelöst) versetzt und im Fluorometer gemessen. Alle Angaben bezüglich der Konzentrationen beziehen sich wieder auf die Konzentration im finalen Volumen des Reaktionsansatzes. In jeder Position befinden sich also 100  $\mu$ l mit folgenden finalen Konzentrationen:

- Thrombin (90 ng/ml)
- +Protein C (0,87 U/ml)
- +Thrombomodulin (0,175 U/ml)
- +NaCitrat (10 mM)
- +Argatra (50  $\mu$ M)
- +Aptamere (0 bis 666 nM)
- +Pyr-Pro-Arg-AMC-AcOH (50  $\mu$ M)

Das nächste Experiment sollte den zeitabhängigen Einfluss der Aptamere darstellen: Als Aptamerkonzentration wurde 666 nM ausgewählt, da hier ein deutlicher Effekt bei allen Aptameren zu sehen war (siehe Abb. 24 in Kapitel 3.3.1). Dazu wurden jeweils ein Eppendorfcup mit einem Volumen von insgesamt 550  $\mu$ l und einer finalen Konzentration von 90 ng/ml Thrombin mit den drei Aptameren (666 nM) in TBS Puffer vermischt und 10 min inkubiert. In einem zweiten Eppen-

dorfcup lagen die 0,87 U/ml Protein C und 0,175 U/ml Thrombomodulin mit einem Volumen von 550  $\mu$ l vor. Für den Leerwert ist der gleiche Ansatz durchgeführt worden, nur ohne Aptamere. Im Moment des Zusammenfügens dieser beiden Ansätze (jeweils 500  $\mu$ l) wurde die Zeitmessung gestartet. Zu den Zeiten:  $t = 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30$  min wurden dann jeweils 120  $\mu$ l aus dem Ansatz genommen und in Eppendorfcups überführt, in denen 13,3  $\mu$ l NaCitrat (10mM final) vorgelegt waren. Als nächstes folgte die Zugabe von 3,4  $\mu$ l Argatra (50  $\mu$ M final). Die Aktivierung des Protein C im Eppendorfcup war somit gestoppt. Argatra inhibiert die amidolytische Thrombinaktivität, die das fluorogene Peptidsubstrat auch umsetzen würde. Nach 30 min wurden jeweils 50  $\mu$ l in zwei Positionen auf die MTP überführt, so dass für jeden Zeitpunkt zwei Ansätze mit Aptameren und zwei ohne Aptamere zur Verfügung standen. Der Start der Reaktion ist auch in diesem Versuch die Zugabe von 50  $\mu$ l Pyr-Pro-Arg-AMC-AcOH, verdünnt in TBS Puffer, so dass eine finale Konzentration von 50  $\mu$ M im Testansatz vorlag.

#### 2.2.4.2 Thrombingenerierungs-Assay (TGA)

Nach der Untersuchung der Aptamerwirkung im gereinigtem System ist auch in dieser Versuchserie die Charakterisierung im Plasma mittels des TGA erfolgt.

Das Versuchsprinzip des TGA wurde in Kapitel 2.2.3.2 (TGA) dargestellt.

#### **Durchführung**

In dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin in der Plasmamatrix wurde in einem Vorversuch die Thrombomodulinwirkung auf die Parameter des TGA mittels einer Thrombomodulin-Verdünnungsreihe dargestellt, die im defibriniertem Plasma angelegt wurde. Folgende Konzentrationen kamen zum Einsatz: 2,6 1,3 0,7 0,3 0 [U/ml] Thrombomodulin. Diese Plasmathrombomodulin-Verdünnungsreihe wurde dann, wie im Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, im Thrombinoscope untersucht.

Aus diesem Vorversuch war ersichtlich, dass 1,3 U/ml Thrombomodulin die Thrombingenerierung und Aktivität stark senkten, aber nicht vollständig inhibierten, deshalb wurde diese Konzentration verwendet, um eine halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe mit einer maximalen Konzentration von 666 nM anzulegen. Dieser Testansatz (Aptamerverdünnungsreihe und 1,3 U/ml Thrombomodulin) wurde parallel zu einem anderen Testansatz, bestehend aus einer Aptamerverdünnungsreihe in reinem Plasma (ohne Thrombomodulin), angesetzt. Ziel dieses Ansatzes

war es, die Aptamerblockierung des Thrombomodulineffektes gegen den „Leerwert“ der Aptamerverdünnungsreihe in reinem Plasma darzustellen.

#### 2.2.5 Software und Datenanalyse

Die Darstellung der Graphen in Abb. 7 im Kapitel 3.2.1 (Inhibition von Thrombin durch Antithrombin und Heparin), die Abb. 15, 16 und 17 im Kapitel 3.2.4.1 (Thrombingenerierungs-Assay) und die Abb. 27 bis 31 im Kapitel 3.3.3 (Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin in der Plasmamatrix) wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 angefertigt. Für alle weiteren Graphen kam die SigmaPlot<sup>®</sup> 9 Software zur Anwendung.

Die Auswertung der TGA Messungen erfolgte mit der Thrombinoscope<sup>™</sup> Software der Firma Thrombinoscope BV.

Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) ist definiert als die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird. Die  $IC_{50}$  ist somit ein Ausdruck für die Wirkstärke eines Antagonisten und kann aus der Michaeliskonstante ( $K_m$ ), der Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes  $K_i$  und der Substratkonzentration  $[S]$  errechnet werden:

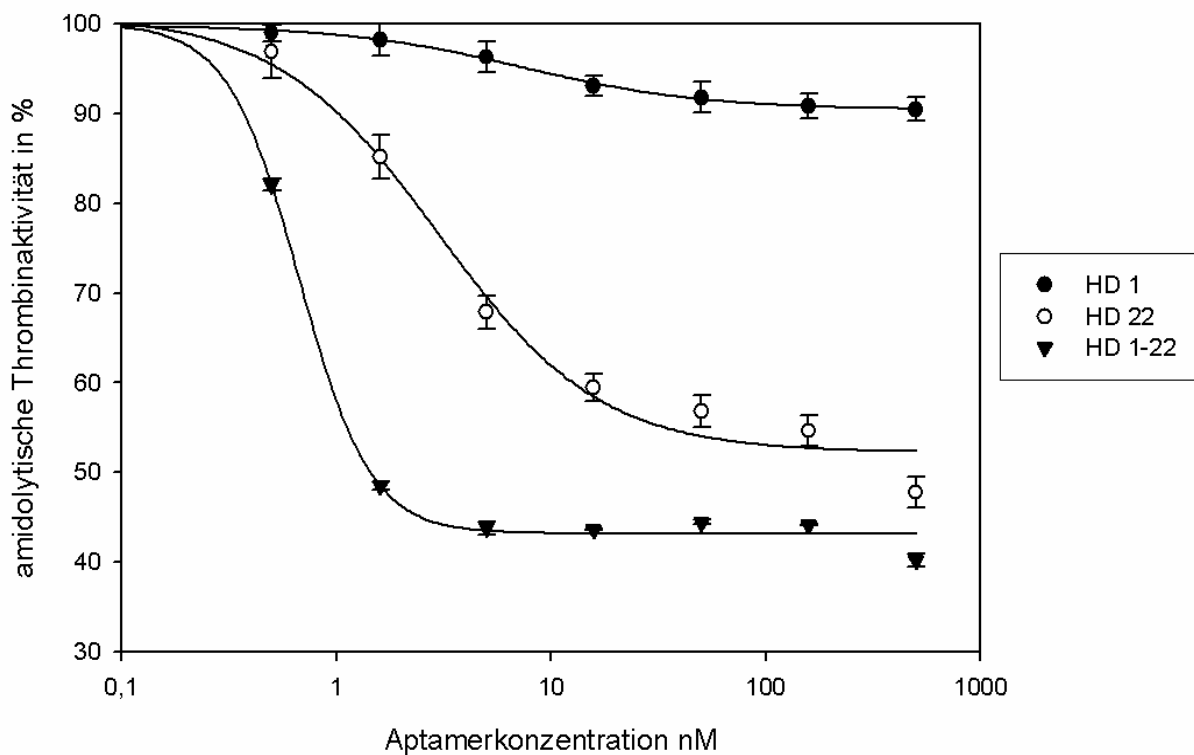
$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) * K_i$$

In dieser Arbeit wurde die  $IC_{50}$  mit Hilfe der SigmaPlot<sup>®</sup> 9 Software errechnet. Die  $IC_{50}$  wird dabei aus einer Four Parameter Logistic Curve berechnet, die durch das Programm erstellt wurde. Angegeben wird die  $IC_{50}$  in nM.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der Aptamere auf die amidolytische Thrombin-Aktivität

Im ersten Experiment wurde die direkte Wirkung der drei Aptamere auf die amidolytische Aktivität des Thrombins untersucht. Zur Darstellung dieser Wirkungen wurde eine halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe aller Aptamere angelegt, mit einer maximalen Konzentration von 500 nM. Der Versuchsaufbau wurde in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Der Leerwert mit 90 ng/ml finaler Thrombinkonzentration ist 100 % gleichgesetzt. Durchgeführt wurde das Experiment in TBS Puffer.



**Abb. 6:** Vergleichende Messung der konzentrationsabhängigen Inhibition der amidolytischen Thrombinaktivität durch die Aptamere; Aktivität von 90 ng/ml Thrombin gleich 100 %. Darstellung von Doppelwerten in TBS Puffer.

Wie sich anhand der Versuchsergebnisse herausstellt, können alle Aptamere die amidolytische Thrombinaktivität konzentrationsabhängig inhibieren. HD1 schafft in einer Konzentration von



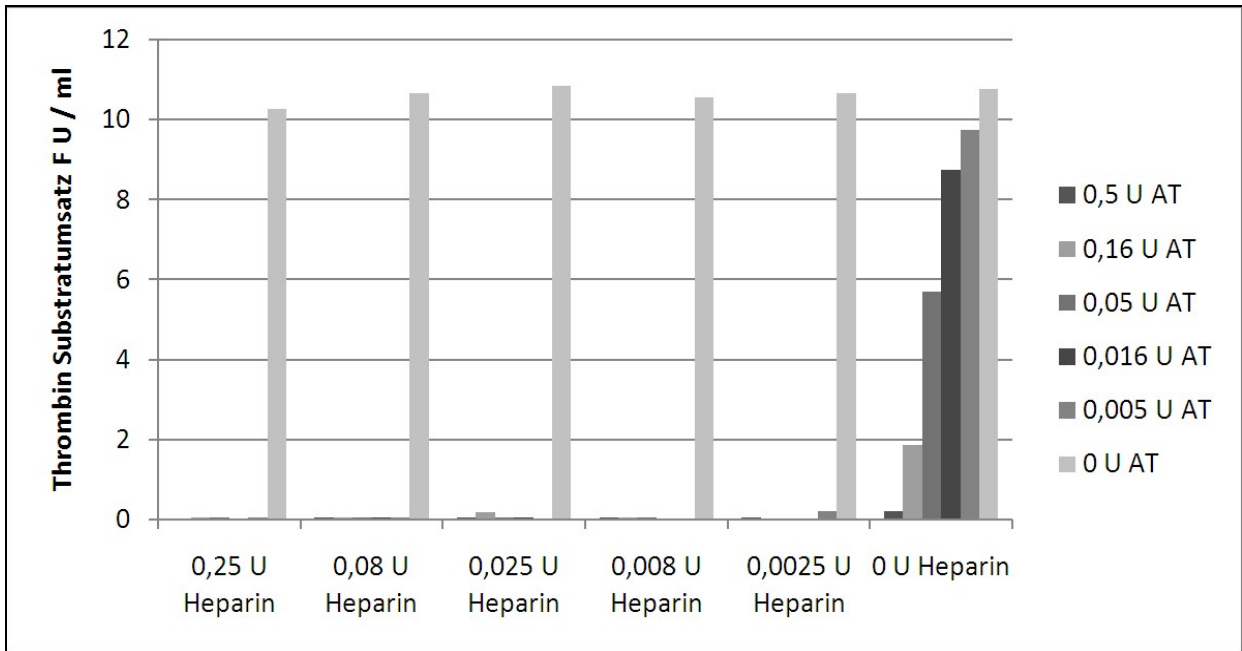
500 nM eine maximale Inhibition von 10 % (bezogen auf die amidolytische Gesamtaktivität von 90 ng/ml Thrombin), HD22 bis zu 53 % und HD1-22 vermag die amidolytische Aktivität um 60 % zu senken. Dabei ist die Wirkung auf die amidolytische Aktivität deutlich ausgeprägter für HD1-22. Dies zeigt sich auch in den  $IC_{50}$  Werten (mittlere inhibitorische Konzentration), die für HD1-22 0,67 nM, für HD22 2,99 nM und für HD1 7,46 nM beträgt.

## 3.2 Einfluss der Aptamere auf die Inhibition von Thrombin durch Antithrombin im gereinigtem System

### 3.2.1 Inhibition von Thrombin durch Antithrombin und Heparin

Der grundlegende Versuchsablauf bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten im Plattenfluorometer war, dass Thrombin durch eine ausreichende Antithrombinkonzentration und eine Kombination aus Antithrombin mit Heparin vollständig in seiner amidolytischen Funktion inhibiert wird. Durch die Zugabe der Aptamere, bei denen vermutet wurde, dass diese die Interaktion zwischen Antithrombin und Thrombin beeinflussen können, müsste Thrombin also wieder in der Lage sein, trotz der Anwesenheit von AT und Heparin, ein fluorogenes Peptid-Substrat zu spalten. Der erste Schritt lag dementsprechend in der Ermittlung der Antithrombin- und Heparinkonzentrationen, die Thrombin vollständig blockieren. Dazu wurde eine halblogarithmische Schachbrettverdünnungsreihe mit Heparin und Antithrombin angelegt. Antithrombin und Heparin lagen jeweils in Konzentrationen zwischen 0,25 und 0,0025 U/ml vor. Als finale Thrombinkonzentration wurden auch hier die schon im Experiment 3.1 verwendeten 90 ng/ml ausgewählt. Als fluorogenes Substrat kam Z-Gly-Gly-Arg-AMC in einer Konzentration von 100 mM zum Einsatz. Als Puffer wurden PBS- bzw. TBS Puffer verwendet.

Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abb. 7 dargestellt:



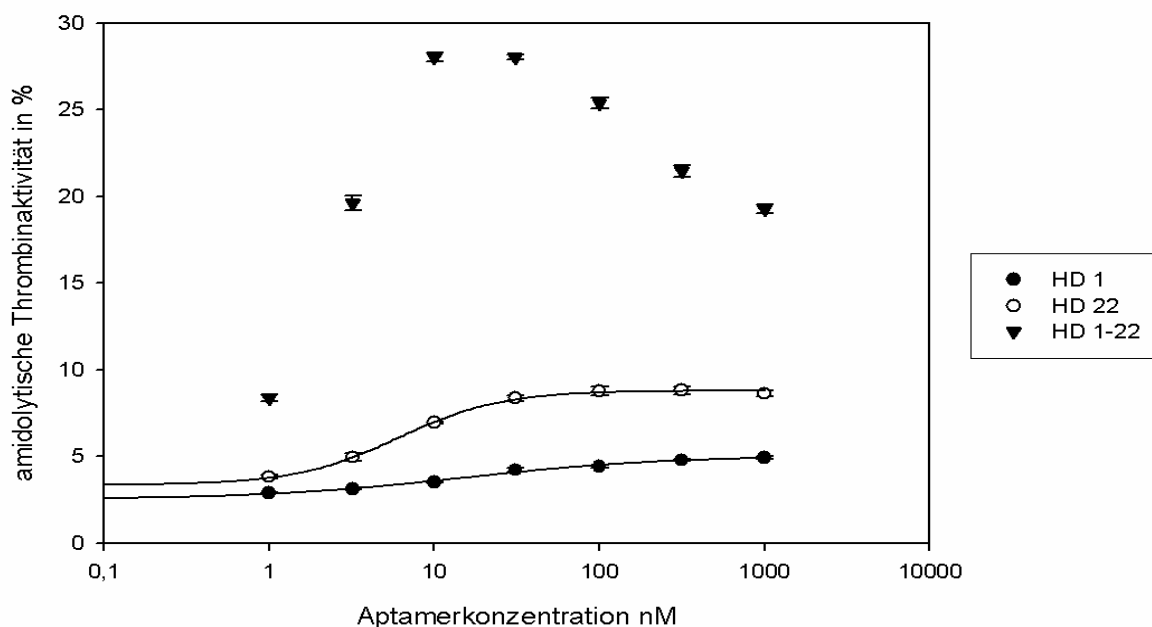
**Abb. 7:** Messung der amidolytische Thrombin-Aktivität in Abhängigkeit von Antithrombin- und Heparin-konzentrationen; durchgeführt im TBS Puffer. Darstellung von Mittelwerten.

Anhand dieser Ergebnisse konnte festgelegt werden, dass Antithrombin in einer Konzentration von 0,5 U/ml die amidolytische Aktivität von 90 ng/ml Thrombin vollständig blockiert. Wenn zusätzlich mindestens 0,0025 U/ml Heparin in der Lösung war, kam es zu einer erwarteten Wirkungsverstärkung von AT. Hier war noch eine Konzentration von 0,016 U/ml AT nötig, um die amidolytische Aktivität von 90 ng/ml Thrombin zu inhibieren. Diese Konzentrationen sind im PBS- und TBS-Puffer gültig. In den nachfolgenden Experimenten konnten diese Konzentrationen verwendet werden, um die Wirkung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen und den zeitlichen Verlauf der Aptamervermittelten Blockierung der Thrombininhibition zu bestimmen. In den folgenden Versuchen wurde jedoch nur noch TBS Puffer verwendet. Der Grund hierfür ist die Tatsache, dass  $\text{Ca}^{2+}$  im PBS Puffer ausfällt. Da  $\text{Ca}^{2+}$  allerdings ein wichtiger Co-Faktor in der Blutgerinnung ist und viele Interaktionen verstärkt und überhaupt erst möglich macht (zum Beispiel als Bestandteil des Faktor-X-Aktivierungskomplex (Ruf *et al.*, 1991)), wurde, um den physiologischen Bedingungen näher zu kommen, nachfolgend nur noch TBS Puffer verwendet.

### 3.2.2 Konzentrationsabhängige Aptamerwirkung auf die Inhibition von Thrombin durch AT

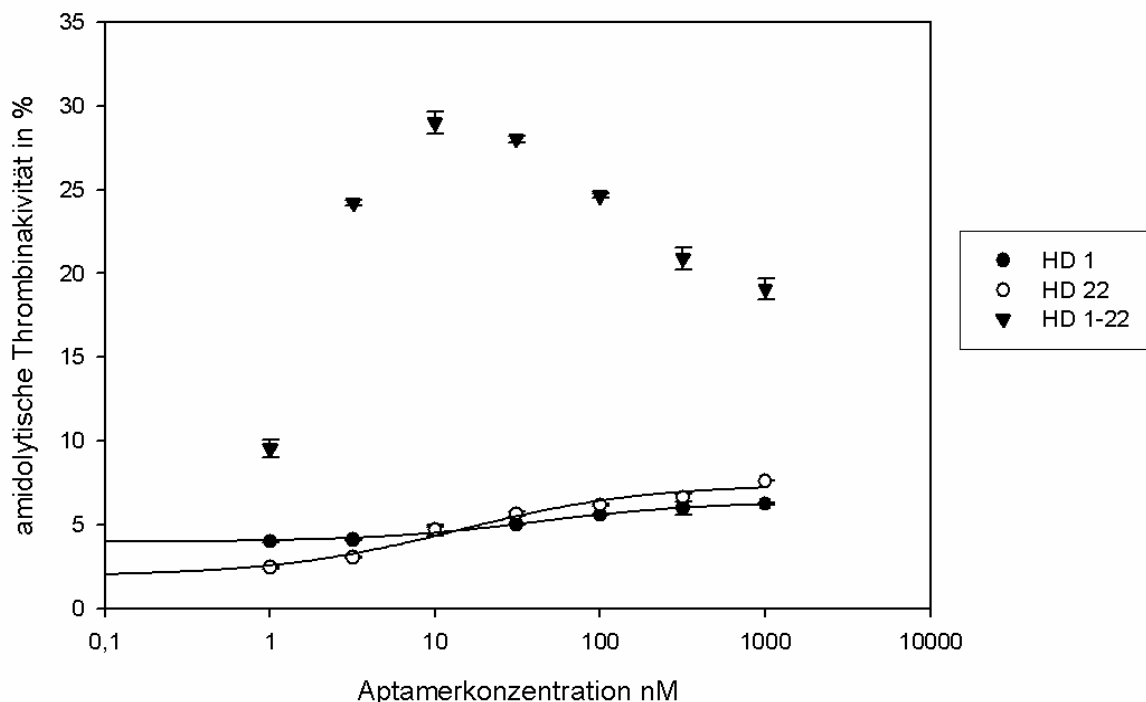
In diesem Versuch sollte die Wirkung der Aptamere auf die Inhibition Thrombins durch AT und Heparin untersucht werden. Es wurde eine Aptamerverdünnungsreihe angelegt, beginnend bei 1000 nM halblogarithmisch verdünnt bis auf 0 nM.

Diese Verdünnungsreihen waren angelegt in TBS Puffer, mit CaCl (5 nM). Um eine Wirkung der Phospholipide auf die Thrombininhibition durch AT und die Aptamerwirkung darzustellen, kamen jeweils ein Ansatz mit und einer ohne Phospholipide (10  $\mu$ M) zur Anwendung. Als finale Thrombinkonzentration wurde, wie in den Vorversuchen festgelegt, 90 ng/ml verwendet und eine Antithrombinkonzentration, wie im vorherigen Versuch ermittelt, von 0,5 U/ml. In Kombination mit 0,005 U/ml Heparin wurde dabei nur 0,016 U/ml AT verwendet. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das finale Volumen, nach Zugabe von allen Volumina in den Reaktionsansatz. Der genaue Versuchsaufbau und die Durchführung wurden im Methodikkapitel 2.2.2 beschrieben. Zuerst erfolgten die Durchläufe mit 0,5 U/ml AT ohne Heparin. Im ersten Ansatz befinden sich außerdem keine PL (Abb. 8), in dem zweiten Durchlauf 10  $\mu$ M PL (Abb. 9). Ergebnisse:



**Abb. 8:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration; Durchgeführt in TBS-Puffer mit 0,5 U/ml AT und **keine Phospholipide**. Dargestellung von Mittelwerten. Die Aktivität von 90 ng/ml Thrombin ist gleich 100 %.

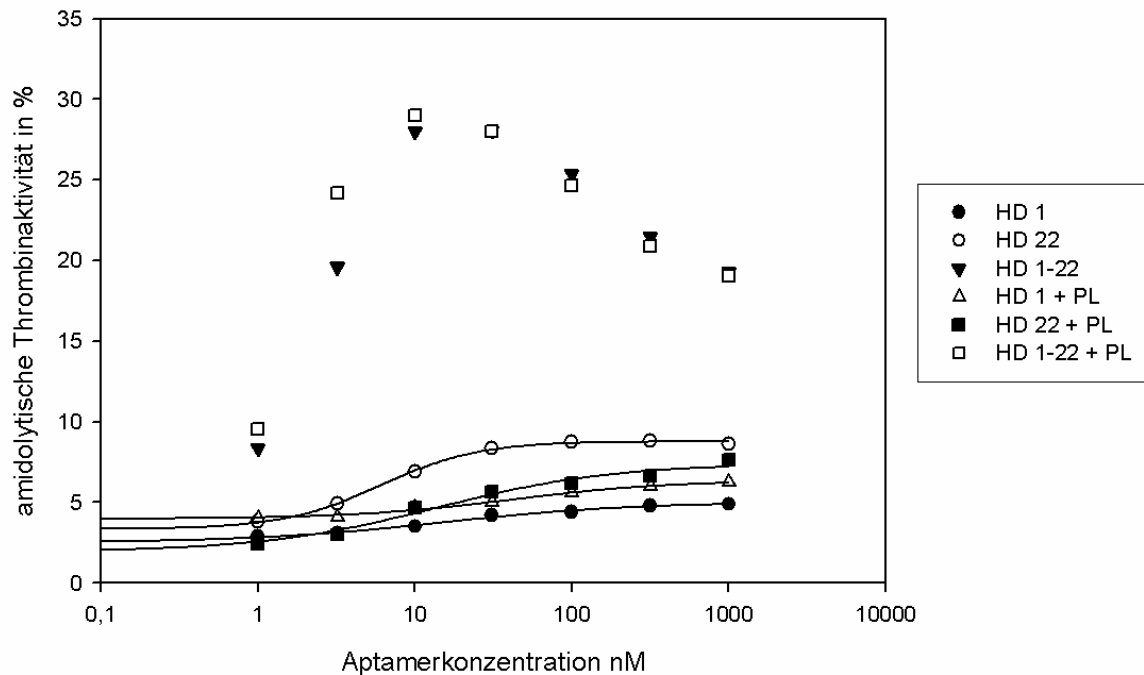
Diese Messwerte zeigen, dass mit steigender Aptamerkonzentration die amidolytische Aktivität des Thrombins erhalten bleibt und dementsprechend die Inhibition des Thrombins durch AT zumindest teilweise verhindert werden konnte. HD1 steigert die amidolytischen Thrombinaktivität um 5 %, HD22 um 8 % und HD1-22 um maximal 28 %. Auffallend ist hier jedoch, dass hohe HD1-22 Konzentrationen (von über 10 nM) wieder zu einem Abfall der gemessenen Thrombin-Aktivität führen. Dies lässt sich jedoch aus der aptamereigenen Inhibition der amidolytischen Thrombinaktivität erklären, welche in Kapitel 3.1 dargestellt wurden.



**Abb. 9:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration. Durchgeführt in TBS-Puffer mit 0,5 U/ml AT und mit  $10 \mu\text{M}$  Phospholipide. Dargestellung von Mittelwerten Aktivität von 90 ng/ml Thrombin ist gleich 100 %.

Auch in Anwesenheit der PL können die Aptamere die amidolytische Aktivität des Thrombins wieder herstellen. HD1 steigert die Aktivität Thrombins auf 6 %, HD22 auf 7 % und HD1-22 auf maximal 30 % wobei auch in diesem Testansatz mit PL die hohen HD1-22 Konzentrationen ab 10 nM zu einem Abfall der amidolytischen Thombinaktivität führen.

Nachfolgend sind Abb. 8 und Abb. 9 zusammengefasst, um den Einfluss der PL auf die Aptamerwirkung zu verdeutlichen.

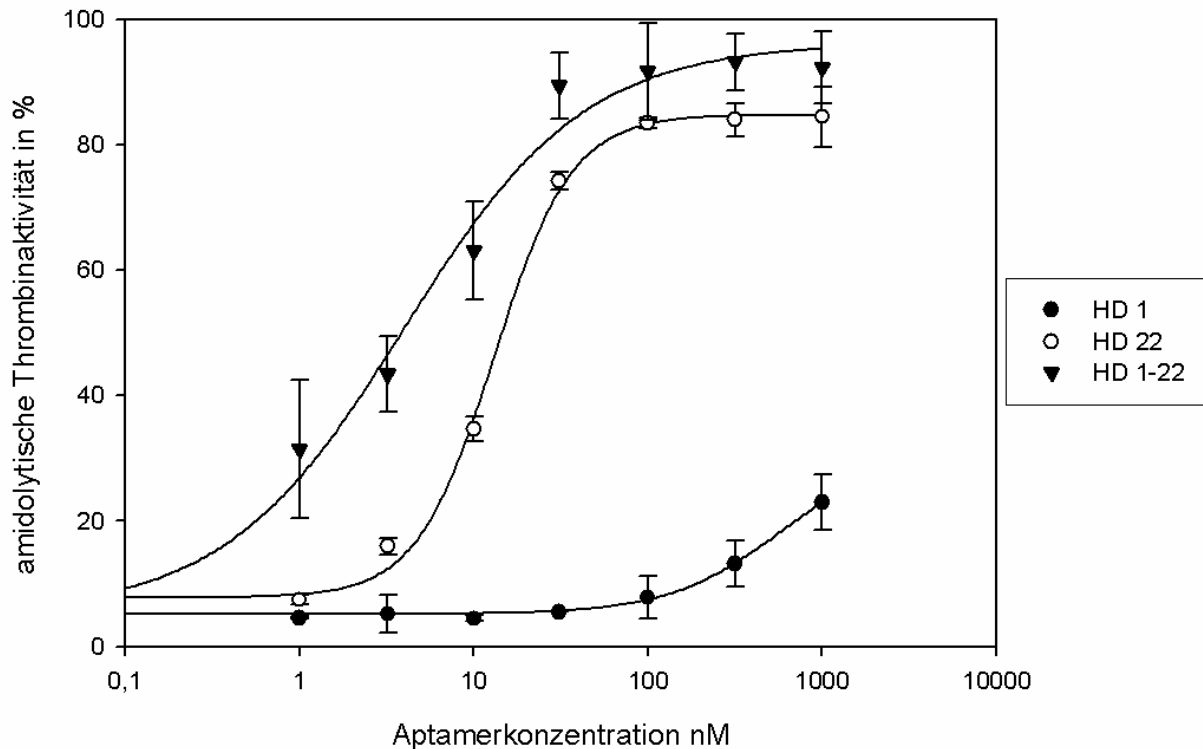


**Abb. 10:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration; Direkter Vergleich der Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  PL; Durchgeführt in TBS Puffer mit 0,5 U/ml AT; Aktivität von 90 ng/ml Thrombin (Leerwert) gleich 100 %. Darstellung von Doppelwerten.

Aus diesen Versuchsergebnissen (Abb. 10) ist ersichtlich, dass die Aptamere in der Lage sind, die amidolytische Aktivität des Thrombins unterschiedlich stark vor der Inaktivierung durch AT zu schützen, was einer Blockierung der AT-Thrombinbindung entspricht. Die PL nehmen dabei keinen Einfluss. Die Aptamere können also nach diesen Versuchsergebnissen mit der Bindung an den Exosite die Wirkung von AT an Thrombin beeinflussen.

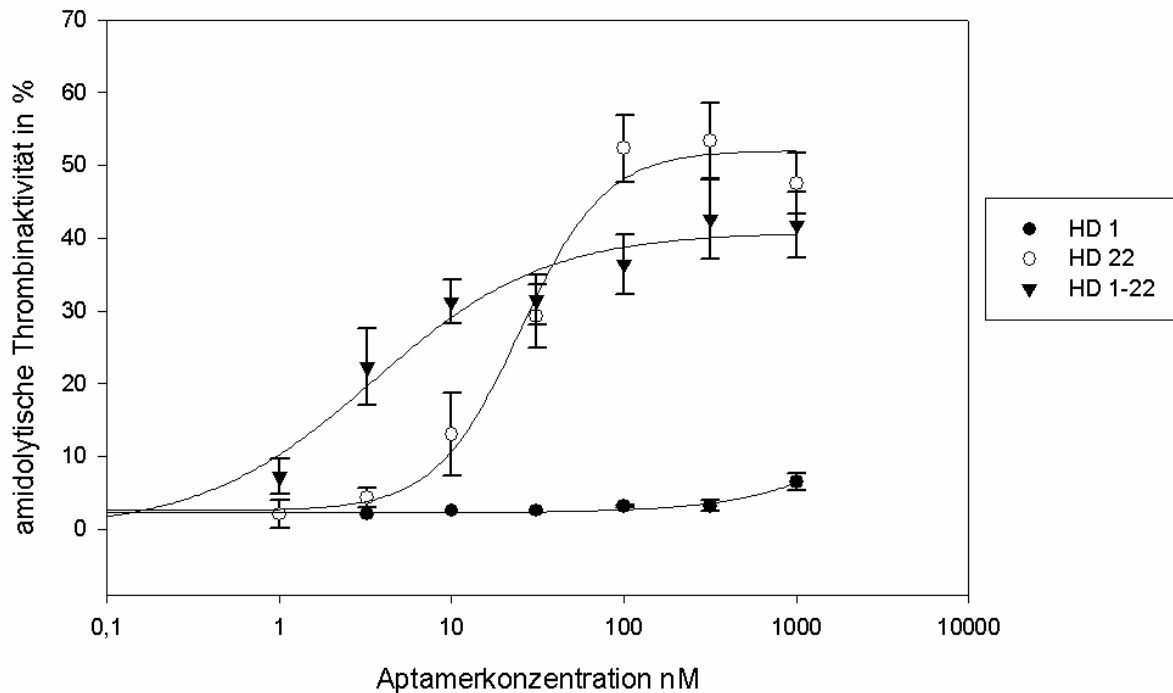
Nachfolgend wurde nun die Wirkung der Kombination aus Heparin und AT im TBS-Puffer untersucht, um zu beweisen, dass die Aptamere auch die Heparinbindung an die Exosite 2 blockieren können. Zu erwarten wäre, dass HD22 und HD1-22 Effekte zeigen, da diese direkt an die Exosite 2 binden können, HD1 jedoch nicht, da es an die Exosite 1 bindet.

Als erstes wird in Abb.11 der Reaktionsansatz ohne PL und darauf folgend der Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  PL (Abb. 12) dargestellt.



**Abb. 11:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration; Durchgeführt in TBS-Puffer mit 0,005 U/ml Heparin und 0,016 U/ml AT, **ohne Phospholipide**. Darstellung von Mittelwerten. Aktivität von 90 ng/ml Thrombin (Leerwert) ist gleich 100 %.

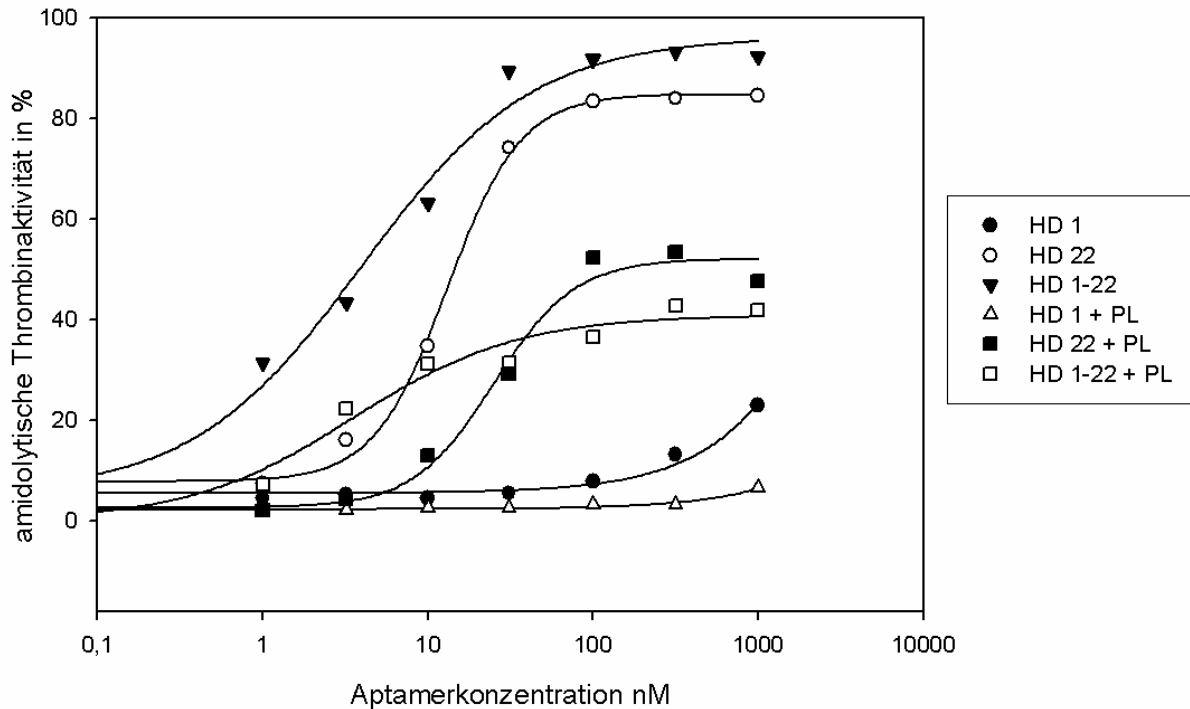
Auffallend ist hier der deutliche Anstieg der amidolytischen Thrombinaktivität mit steigender Aptamerkonzentration bei den Aptameren HD22 und HD1-22. HD1 steigert die Aktivität lediglich von 6 % auf 23 %, HD22 von 6 % auf 84 % und HD1-22 kann die Heparin und AT Blockierung soweit blocken, dass die amidolytische Thrombinaktivität bis auf 91 % (des Leerwertes für 90 ng/ml Thrombin) wieder hergestellt ist. Die guten Ergebnisse für HD22 und HD1-22 lassen sich durch die direkte Exosite 2 Blockierung, die auch die Bindungsstelle für Heparin ist, erklären. Der deutliche Effekt durch HD1 ist nicht mit einer direkten Blockade der Heparinbindungsstelle zu erklären, sondern durch eine allosterische Umlagerung, die von der Exosite 1 ausgehend auf die Exosite 2 wirkt und eine Heparinbindung erschwert. Diese Effekte werden im Diskussionsteil (Kapitel 4.3.2) erörtert.



**Abb. 12:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration im TBS-Puffer mit 0,005 U/ml Heparin und 0,016 U/ml AT und **mit 10  $\mu$ M Phospholipide**, Darstellung von Mittelwerten. Aktivität von 90 ng/ml Thrombin (Leerwert) gleich 100 %.

Die Anwesenheit von PL schwächt die Wirkungen der Aptamere etwas ab. HD1 bewirkt eine Aktivitätssteigerung von 4 %, HD22 von 46 % und HD1-22 von 40 % gegenüber dem Leerwert, bei dem die Heparin- und AT-Konzentration das Thrombin vollständig blockieren.

Faßt man beide Ergebnisse (Abb. 11 und Abb. 12) zusammen (Abb. 13), so zeigt diese Graphik noch einmal, dass die PL die Wirkung der Heparin- und der AT Blockierung an Thrombin durch die Aptamere verringern. Da dieser Effekt nicht bei der alleinigen AT Blockierung zu sehen war, müssen die PL die Wirkung des Heparins verstärken. Ob diese Wirkungsverstärkung in Anwesenheit der PL jedoch auf einer Verbesserung der Bindung von Heparin an Thrombin oder aber zwischen Heparin und AT beruht, ist mit dieser Versuchstechnik nicht zu erklären.



**Abb. 13:** Messung der amidolytischen Thrombin-Aktivität in Abhängigkeit der Aptamerkonzentration, in TBS Puffer mit 0,016 U/ml AT und 0,005 U/ml Heparin; Direkter Vergleich der Wirkung von 10  $\mu$ M PL. Darstellung von Mittelwerten. Aktivität von 90 ng/ml Thrombin (Leerwert) gleich 100 %.

Es konnte also gezeigt werden, dass alle drei Aptamere in der Lage sind, die Bindung von Thrombin an AT und Heparin zu beeinflussen, wobei HD1 dem Fusionsaptamer und HD22 in der Wirkung unterlegen ist. Die Schwächung der Wirkung von HD1 ist in Anwesenheit von PL am deutlichsten ausgeprägt. Hier stellte sich die Frage nach der Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe, wie lange also die Aptamere Thrombin vor der Inaktivierung durch AT schützen können? Dies wurde im Weiteren untersucht.

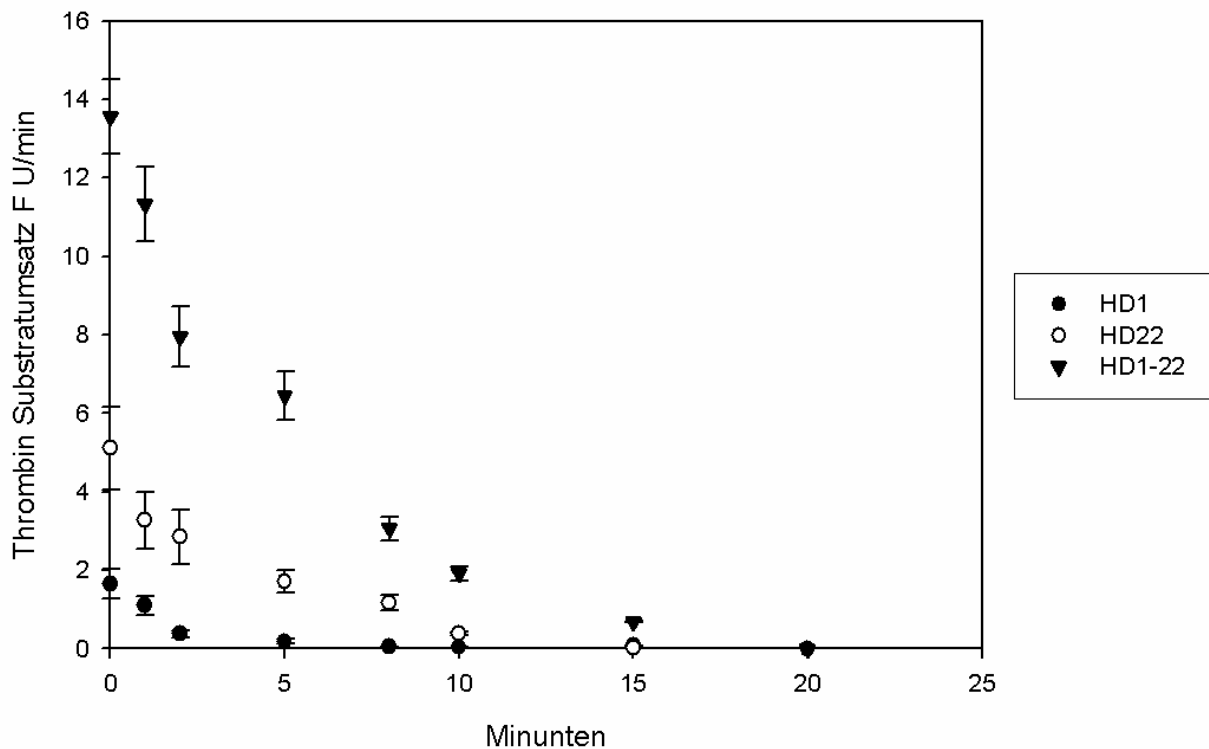
### 3.2.3 Aptamer-vermittelte Blockierung der Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Zeit

In den ersten Versuchsreihen (Kap. 3.2.2) wurden die konzentrationsabhängigen Einflüsse der Aptamere untersucht. Mit den nachfolgenden Experimenten sollte nun der zeitliche Verlauf der Exosite-Blockierung durch die Aptamere dargestellt werden. Dies ist wichtig, da die Bindung zwischen Aptamer und Thrombin reversibel ist, die des Antithrombin mit Thrombin jedoch irreversibel. Ziel war es zu ermitteln, wie lange die Aptamere einen Erhalt der amidolytischen Aktivität hervorrufen können, bis die Aptamere abdissozieren und das Thrombin irreversibel von AT



blockiert werden kann. Der genaue Versuchsaufbau und die Durchführung wurden im Methodik-kapitel 2.2.2 beschrieben. Dieses Experiment gibt Auskunft über die Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe im TBS-Puffer. Die Untersuchung der Komplexstabilität im Plasma wird in den TGA Experimenten mit der start tail Zeit diskutiert (siehe Abb. 23).

Dargestellt ist im folgenden Diagramm auf der x-Achse die Inkubationszeit von AT mit den bestehenden Thrombin-Aptamer-Komplexen. Der 20 Minuten-Wert besagt also, dass AT 20 Minuten lang um den bestehenden Thrombin-Aptamer-Komplex konkurrieren konnte, wobei der 0 Minuten-Wert eine fast simultane Zugabe von AT und dem Start der Reaktion ausdrückt. Dargestellt ist die Differenz zwischen den parallel durchgeführten Ansätzen: Leerwert und Aptameransatz.



**Abb. 14:** Messung der amidolytischen Thrombinaktivität, abhängig von der AT-Thrombin Inkubationszeit; Dargestellt ist die Aktivitätsdifferenz zwischen dem Leerwert und dem Aptameransatz mit einer Konzentration von 60 nM. Darstellung von Mittelwerten.

In diesem Diagramm ist ersichtlich: Je höher die Differenz zwischen Leerwert und Aptameransatz ist, desto mehr Thrombin befand sich in einem Thrombin-Aptamer-Komplex und war in der Lösung durch die Aptamere vor der AT Inhibition geschützt. Der zeitliche Verlauf verdeutlicht

nun, dass die Aktivität nach 20 Minuten (HD1-22), nach 10 Minuten (HD22) und sogar nach 5 Minuten (HD1) schon aufgehoben ist. Es ergibt sich eine Halbwertszeit der Aptamer-Thrombin-Komplexe für HD1 von 1,5 Minuten, für HD22 von 3,25 Minuten und für HD1-22 von 4,5 Minuten.

Dieser Versuch konnte nicht mit Heparin durchgeführt werden, da Heparin die Inhibition zu sehr beschleunigt und keine Effekte mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus sichtbar gemacht werden konnten.

In der nächsten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Aptamere auch im Plasma eine Wirkung erzielen können.

### 3.2.4 Einfluss der Aptamere auf die Inhibition von Thrombin durch Antithrombin in der Plasmamatrix

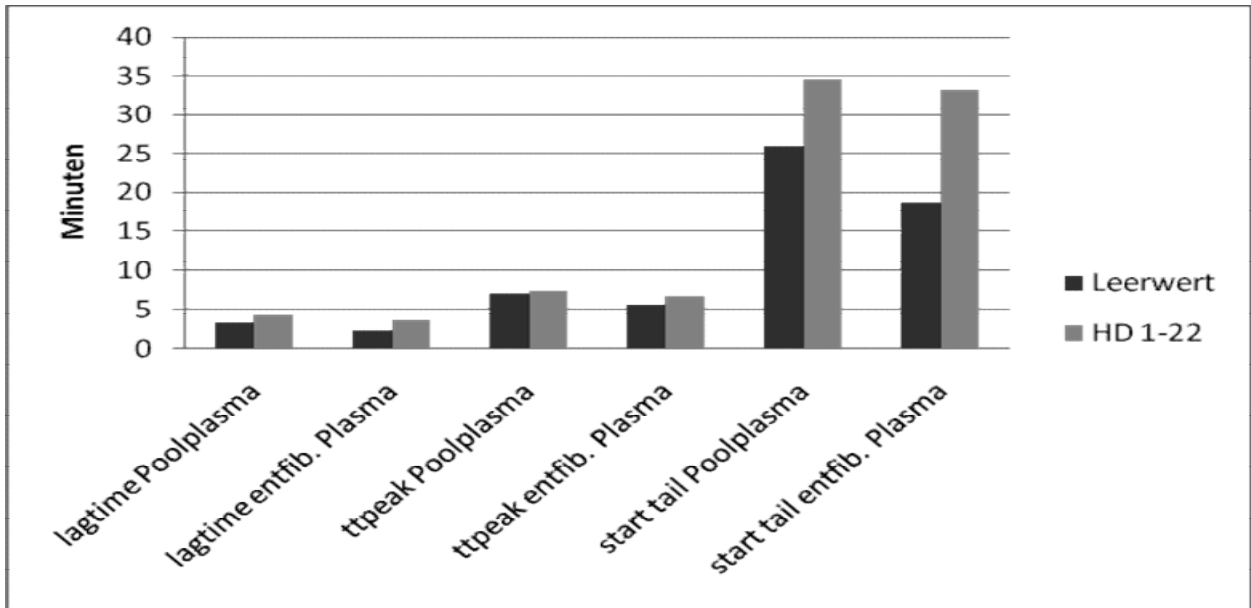
#### 3.2.4.1 Thrombingenerierungs-Assay (TGA)

Wie im Methodenteil (2.2.3.2) beschrieben, erfasst der Thrombingenerierungs-Assay die über den extrinsischen Weg gestartete Thrombingenerierung anhand des Umsatzes eines fluorogenen Peptid-Substrats. Mit dieser Methode kann die maximale Bildungsrate (peak) und letztendlich auch die absolut gebildete Menge an Thrombin im Plasma (ETP) über die Zeit dargestellt werden. Da im Plasma auch antikoagulatorische Faktoren, in erster Linie AT, vorkommen und im Verlauf der TGA-Messung Thrombin durch diese inhibiert wird, sind die ermittelten Werte der Thrombinaktivität sowohl ein Ergebnis der Aktivierung und der amidolytischen Aktivität des Thrombins als auch seiner Inhibition durch AT und andere antikoagulatorische Faktoren.

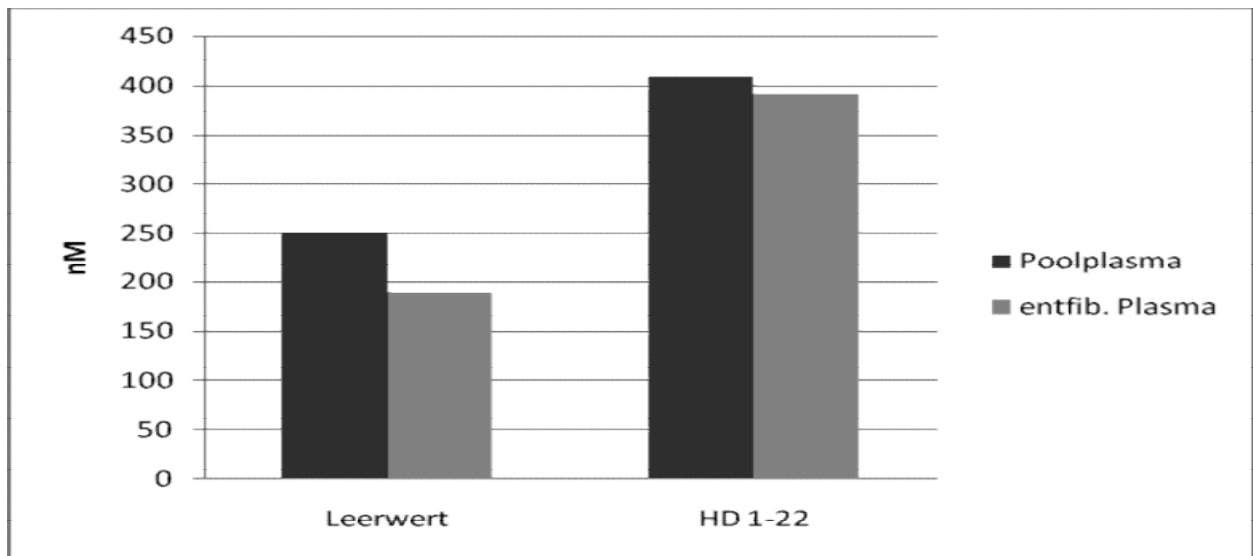
Mit diesem Testaufbau ist es also prinzipiell möglich, die Wirkung der Aptamere auf Thrombin, aber auch auf alle anderen Bindungspartner an Thrombin (die durch die Aptamere in ihre Bindung verhindert werden und die TGA-Werte beeinflussen) darzustellen.

Um eine Vergleichbarkeit mit den darauffolgenden Versuchen (3.2.4.2 TAT-ELISA) zu ermöglichen, bei denen defibriniertes Plasma benötigt wird (da eine Gerinnung die Messungen mittels des TAT-Elisa unmöglich machen würde), musste zunächst in einem Vorversuch der Unterschied zwischen normalen und defibrinierten Poolplasma im TGA dargestellt werden. Es wurden sowohl im Poolplasma als auch im defibriniertes Plasma Dreifachwerte für die Leerwerte und die Aptameransätze (finale Konzentration: 333 nM) angelegt. Die Proben wurden dann (wie in Kapi-

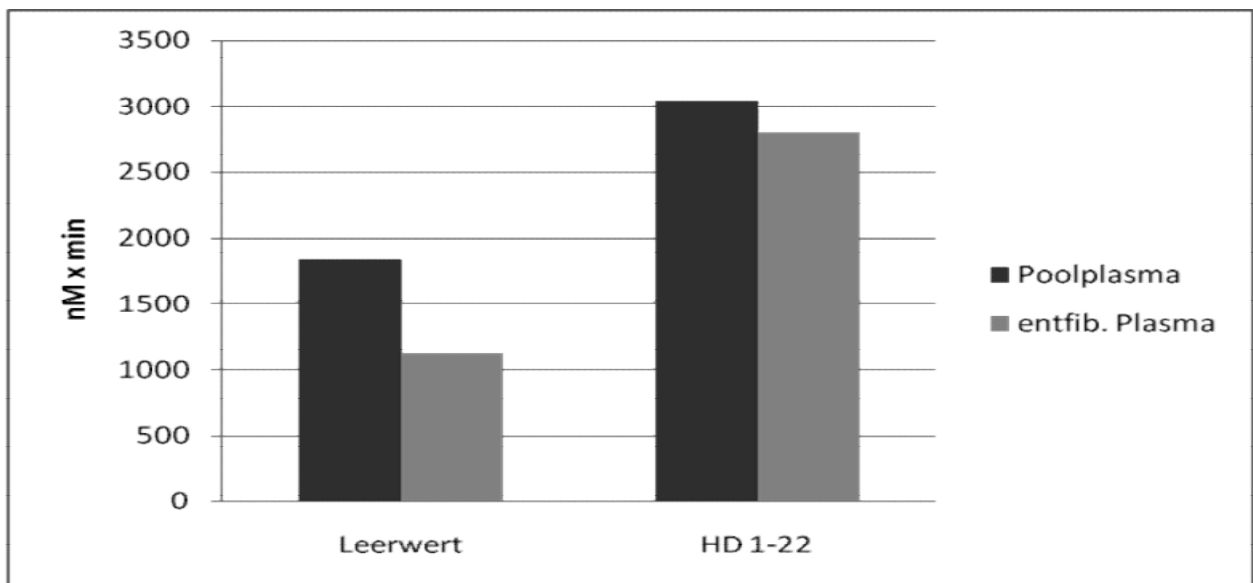
tel 2.2.3.2 beschrieben) auf die MTP gegeben und mit PPP und der FluCa-Lösung vermengt, um die Reaktion zu starten. Die folgenden Abbildungen (Abb. 15, 16 und 17) zeigen zunächst die Messergebnisse der TGA-Parameter (lagtime, ETP, Peak, ttPeak und start Tail) gegenübergestellt im Poolplasma und im defibrinisierten Plasma. Es wurde der Einfluss des Aptamers HD1-22 in einer Konzentration von 333 nM mit einem Leerwert verglichen:



**Abb. 15:** Vergleichende Messungen der zeitabhängigen Faktoren des TGA (lagtime, ttpeak und start tail) in defibrinisiertem Plasma und Poolplasma. Eine Konzentration von 333 nM HD1-22 ist dem Leerwert gegenübergestellt. Darstellung von Mittelwerten.



**Abb. 16:** Vergleichende Messung des peaks im TGA in defibrinierten Plasma und Poolplasma. Eine Konzentration von 333 nM HD1-22 ist dem Leerwert gegenübergestellt. Darstellung von Mittelwerten.

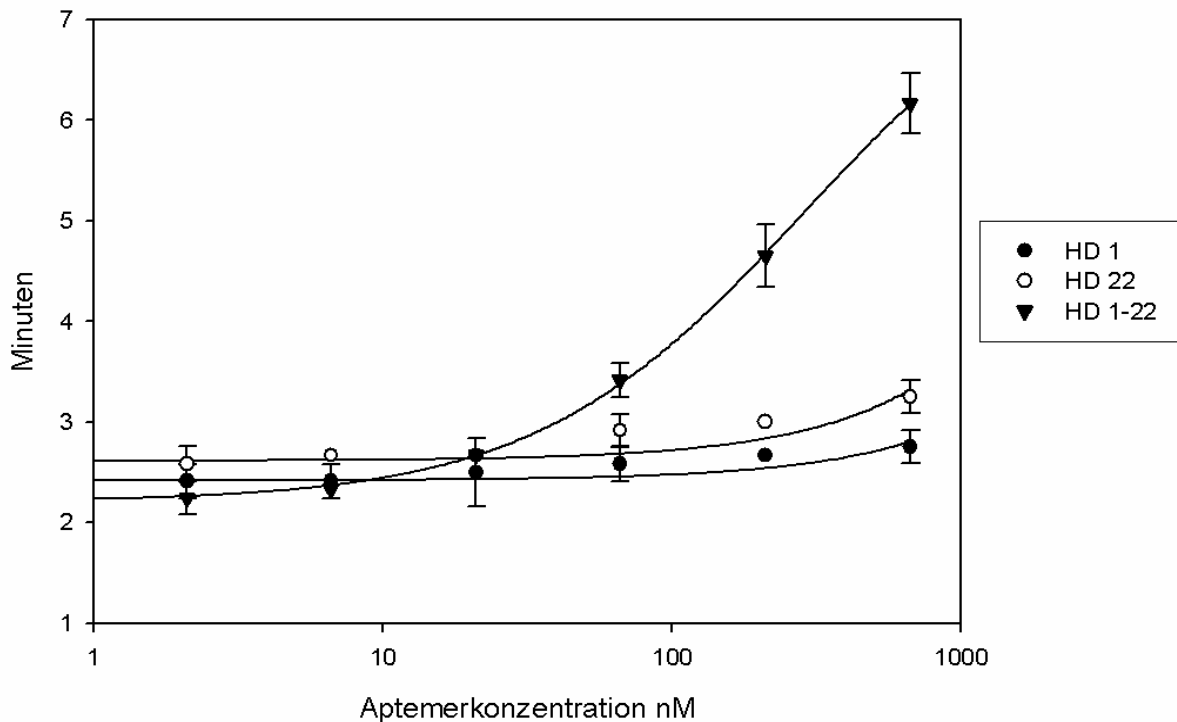


**Abb. 17:** Vergleichende Messung der ETP im TGA in defibrinierten Plasma und Poolplasma. Eine Konzentration von 333 nM HD1-22 ist dem Leerwert gegenübergestellt. Darstellung von Mittelwerten.

Mit diesem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass im Poolplasma die Wirkung des Aptamers HD1-22 im Vergleich zu entfirbinisierten Plasma keine auffälligen Unterschiede aufweist. Zwar ist das Signal (vgl. Abb. 17 ETP im Poolplasma: ca 1800 nM x min zu 1100 nM x min im defibrinierten Plasma) insgesamt im defibrinierten Plasma schwächer, aber dieser Unterschied nimmt keinen Einfluss auf die generelle Tendenz der Aptamerwirkung. Das schwächere Signal

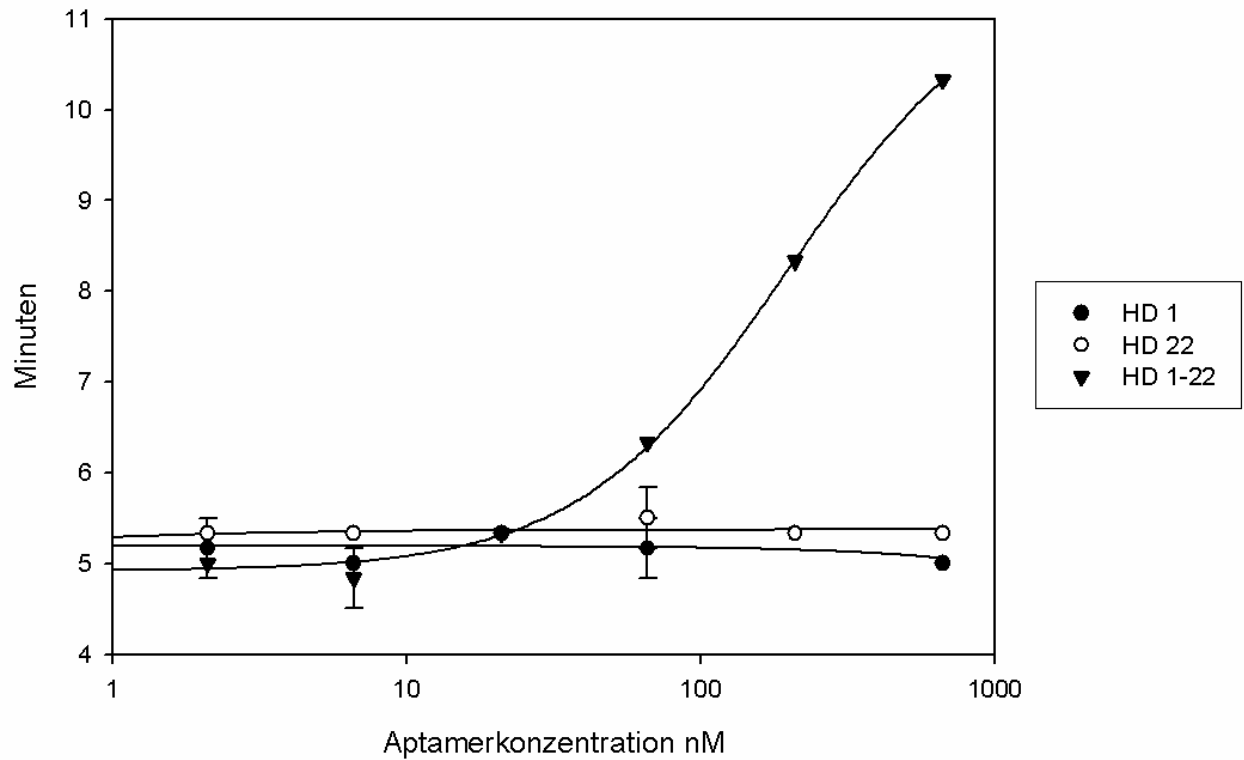
des ETP und des peak-Wertes könnte durch eine teilweise Thrombinextraktion während der Entfibrinisierung erklärt werden. Zusätzlich könnte der fehlende Schutz des Fibrinclots, bei dem das fibringebundene Thrombin vor der AT Inhibition geschützt wird, einen Abfall dieser beiden Werte erklären.

Nun folgten die eigentlichen Experimente, um die konzentrationsabhängige Wirkung der Aptamere auf die Parameter des TGAs im defibrinisierten Plasma darzustellen. Zu diesem Zweck kamen halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihen, in TBS Puffer angelegt, mit einer maximalen finalen Aptamerkonzentration von 666 nM für alle drei Aptamere zum Einsatz, welche in den folgenden fünf Graphen (Abb. 18- 22) dargestellt werden.



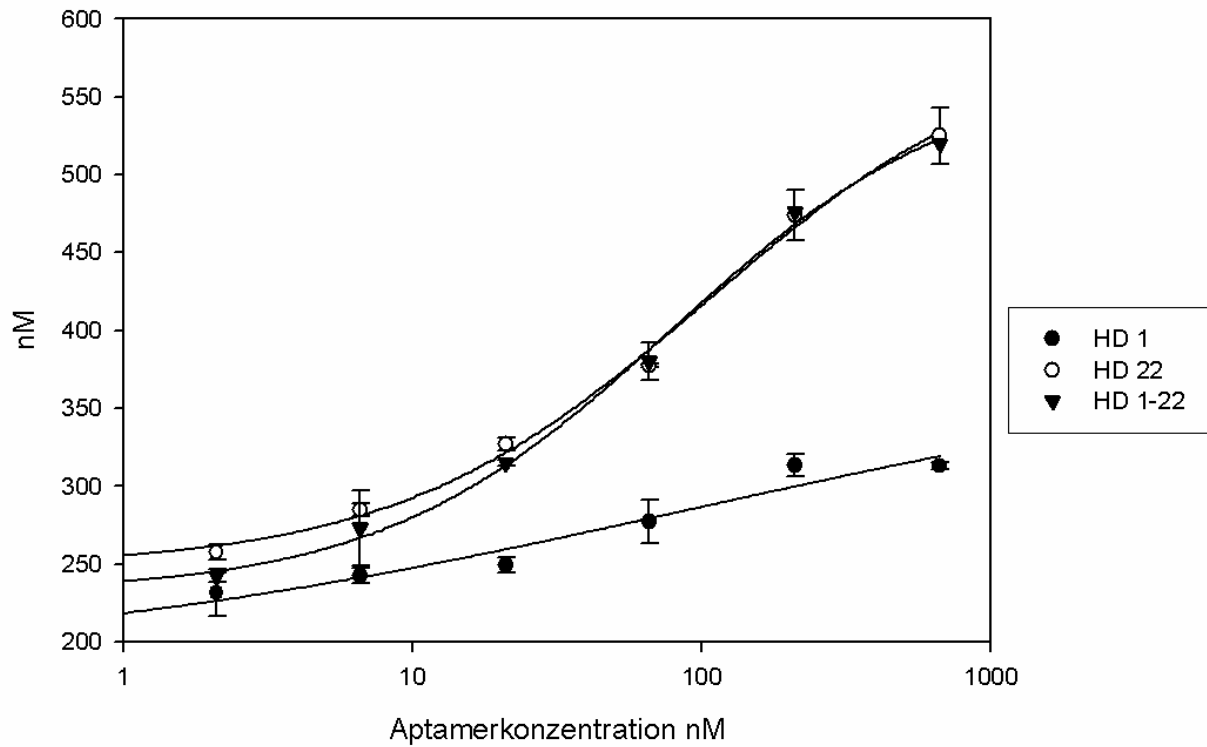
**Abb. 18:** Einfluss der Aptamerkonzentration auf die lagtime im defibrinisierten Poolplasma. Darstellung von Mittelwerten.

In Anwesenheit der Aptamere und bei steigender Konzentration verlängert sich die lagtime unterschiedlich stark. Im Leerwert beträgt die lagtime (also die Zeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung) etwa 2,2 Minuten. HD1 verlängert diese auf 2,7 Minuten, in einer Konzentration von 666 nM, HD22 auf 3,25 Minuten und HD1-22 sogar auf 6,17 Minuten, was einer Steigerung um das 2,8-fache entspricht.



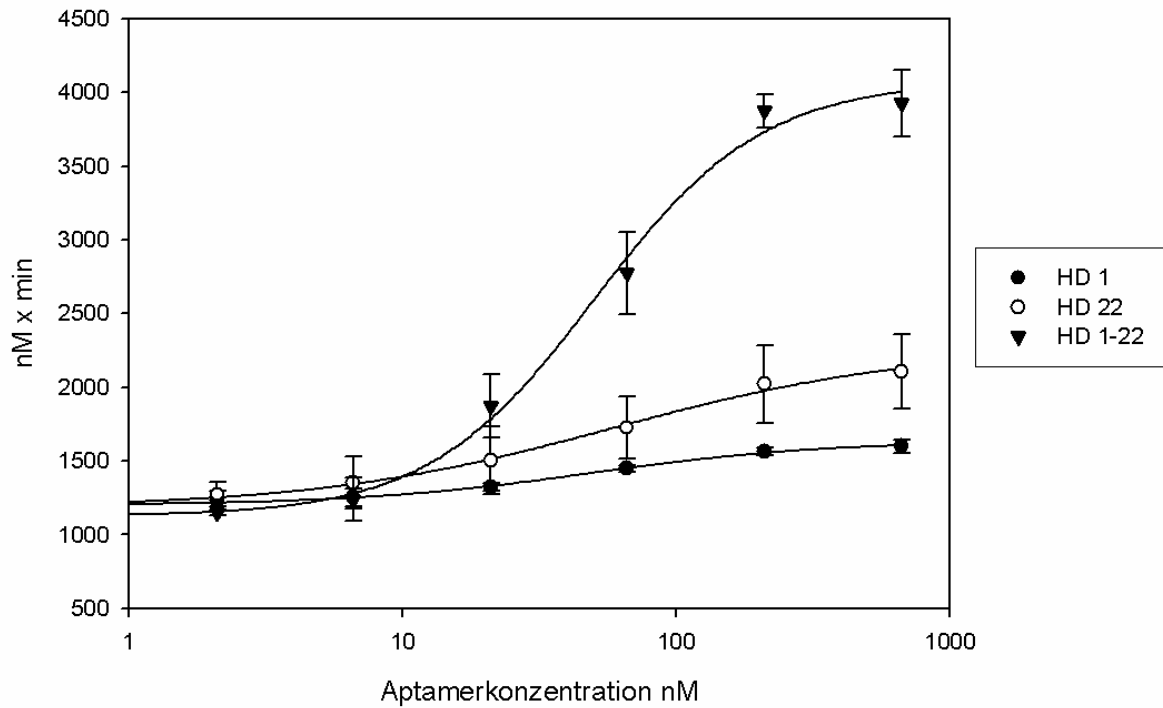
**Abb. 19:** Einfluss der Aptamerkonzentration auf die  $t_{peak}$  im defibrinierten Poolplasma. Darstellung von Mittelwerten.

Der Zeitpunkt bis zum Erreichen des maximalen Thrombinumsatzes ( $t_{peak}$ ) wird durch 666 nM HD1-22 auf rund 10 Minuten verdoppelt, während bei HD1 und HD22 kein messbarer Einfluss nachzuweisen ist.



**Abb. 20:** Einfluss der Aptamerkonzentration auf den peak im defibrinierten Poolplasma. Darstellung von Mittelwerten.

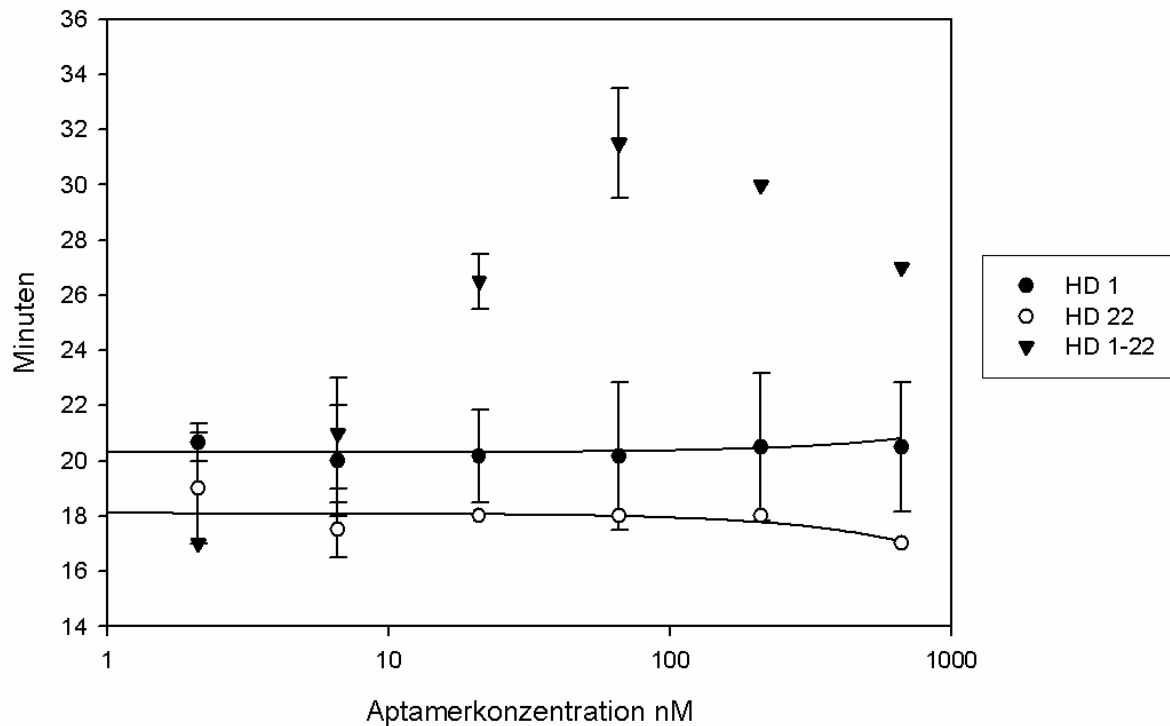
Der maximale Thrombinumsatz, der durch den peak-Wert ausgedrückt wird, vergrößert sich bei steigender Aptamerkonzentration um das 1,7-fache für HD1, um das 2,1-fache für HD22 und um das 2,2-fache für HD1-22 (bei einer maximalen Aptamerkonzentration von 666 nM).



**Abb. 21:** Einfluss der Aptamerkonzentration auf das ETP im defibrinisierten Poolplasma. Darstellung von Mittelwerten.

Die steigende Aptamerkonzentration zeigt bei allen drei Aptameren einen Anstieg des ETP. Der Leerwert von 1150 nM x min kann mit 666 nM HD1 um das 1,3-fache, mit 666 nM HD22 um das 1,8-fache und mit HD1-22 um das 3,4-fache (hier auf 3924 nM x min), gesteigert werden.





**Abb. 22:** Einfluss der Aptamerkonzentration auf die start tail Zeit im defibrinisierten Poolplasma. Darstellung von Mittelwerten.

Einen eindeutigen Einfluss auf die start tail Zeit hat nur HD1-22 mit einer maximalen Verlängerung von 15 Minuten bei 66 nM. Dieser Wert beschreibt die Stabilität der Aptamer-Thrombin Komplexe im Plasma.

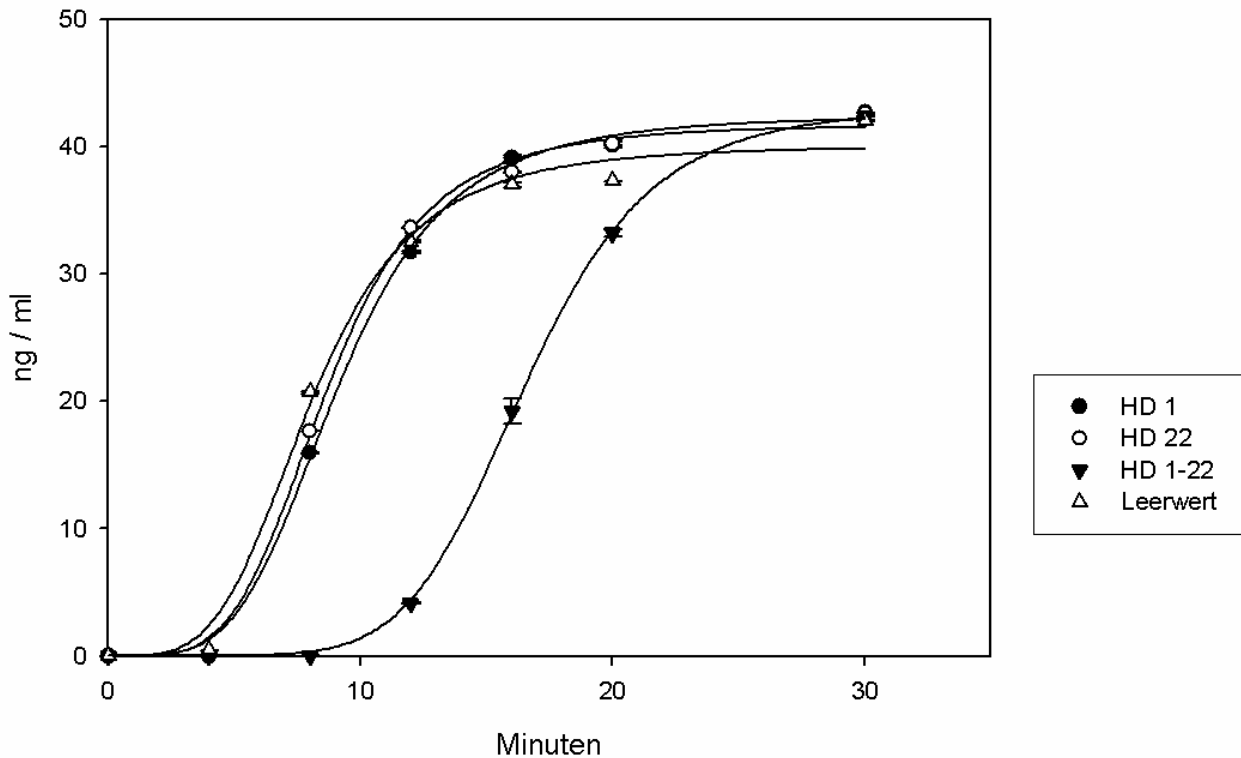
Die bisherigen Versuchsergebnisse sollen im Folgenden kurz interpretiert werden, eine ausführliche Betrachtung findet im Diskussionskapitel statt: Die Aptamere (wobei das Fusionsaptamer den beiden anderen Aptameren HD1 und HD22 deutlich überlegen ist) inhibieren die Aktivierung des Thrombins (verlängerte lagtime) vermutlich in erster Linie durch eine eigenständige Inhibition der amidolytischen Aktivität des Thrombins (wie in Kapitel 3.1 zu sehen war) und durch die Blockierung der Exosites, wodurch eine weitere Bildung von Thrombin verzögert wird (Adams, 2006). Bei Kretz wurde des Weiteren für die Aptamere HD1 und HD1-22 eine Blockierung von Prothrombin beschrieben, was ebenfalls zu einer Verlängerung der lagtime führte (Kretz et al., 2006).

Die Beeinflussung der amidolytischen Thrombinaktivität, die in den Experimenten unter Kapitel 3.1 dargestellt werden konnte, hätte erwartungsgemäß zu einer Verringerung des peaks (Aus-

druck der maximalen Thrombinaktivität) und des ETP (Gesamtaktivität) im Plasma führen müssen. Dieser zu erwartende Effekt lässt sich jedoch nicht darstellen, es kommt sogar zu einer Vergrößerung des peaks und des ETP. Es ist zu vermuten, dass die inhibitorisch wirksamen Bestandteile im Blutplasma in ihrer Funktion behindert werden. Hier wäre das AT als wichtiger Gegenspieler an erster Stelle zu nennen (*Pike et al., 2005*). Die Verlängerung der Thrombinaktivität (start tail) wäre auch mit der Blockierung der AT-Inhibition durch die Aptamere zu erklären. Zur Untersuchung dieser These sollten im folgenden Experiment im Kapitel 3.2.4.2 (Bestimmung von Thrombin-Antithrombin Komplexen) die Antithrombin-Thrombin-Komplexe unter Einfluss der Aptamere direkt in einem strukturellen Test dargestellt werden. Wenn die Aptamere die AT Blockierung verhindern können, dann müssten zu den entsprechenden Zeitpunkten (z.B. während des peaks, oder vor der start tail Zeit) weniger TAT-Komplexe nachzuweisen sein.

#### 3.2.4.2 Bestimmung von Thrombin-Antithrombin Komplexen (TAT Elisa)

In den TGA Versuchen zeigte sich (siehe 3.2.4.1. Thrombingenerierungs Assays, TGA), dass man die Thrombingenerierung zu den unterschiedlichen Zeiten anhand des Substratumsatzes darstellen konnte. In diesem Versuch sollte nun die Thrombin-Antithrombin-Komplexbildung (TAT-Bildung) mittels eines strukturellen Tests zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt werden. Als besonders markante Zeitpunkte wurden 0 min, 4 min (in der lagtime), 8 min (kurz vor dem peak), 12 min (kurz nach dem peak), 16 min (Anfang des tails), 20 min und 30 min (innerhalb des tails) ausgewählt. Der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der Proben waren identisch mit denen im TGA, nur dass die Reaktion zu den bestimmten Zeitpunkten mit NaCitrat und Hirudin gestoppt wurde. Mit diesem Versuch kann so die Vergrößerung des ETP in einen direkten Zusammenhang mit einer Abnahme der Thrombin-Antithrombin-Komplexen gestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.



**Abb. 23:** Bestimmung der TAT Komplexe zu ausgewählten Zeitpunkten in der Thrombingenerierungsphase. Die Minutenwerte der X-Achse beschreiben die Inkubationszeit von AT mit den Thrombin-Aptamer-Komplexen. Die finale Aptamerkonzentration betrug 666 nM. Darstellung von Mittelwerten.

Die Darstellung der Konzentration der TAT-Komplexe zu den bestimmten Zeitpunkten macht deutlich, dass in den HD1-22 Ansätzen zwischen 5 und 25 Minuten deutlich weniger Komplexe gebildet werden als im Leerwert. Dieser Effekt ist für HD1 und HD22 nur bei 8 und 12 Minuten in leichter Ausprägung zu erkennen. Dementsprechend schützen die Aptamere (in erster Linie HD1-22) das Thrombin vor der Inaktivierung durch AT. Des Weiteren zeigt sich für die 0- und 4-Minuten Werte, die noch in der lagtime liegen, dass sich keine TAT-Komplexe gebildet haben oder dass der Testansatz für diese geringen Konzentrationen nicht sensibel genug war und keinen Unterschied zwischen Leerwert- und Aptameransatz darstellen konnte. Die Verlängerung der lagtime (siehe Abb. 18) kommt also durch die direkte Inhibition der amidolytischen Aktivität, der Blockade der Exosites (besonders Exosite), die den positiven Feedbackmechanismus über Faktor V und VIII vermittelt, oder aber durch eine Verzögerung der Aktivierung aus Prothrombin durch die Aptamere zustande, wie für HD1 und HD1-22 beschrieben ist (Kretz *et al.*, 2006). Mit diesem Versuchsaufbau lassen sich diese beiden Phänomene jedoch nicht trennen.

Mit dieser Versuchserie konnte folgendes gezeigt werden: Die Aptamere inhibieren, wie in Kapitel 3.1 gezeigt werden konnte, die amidolytische Thrombinaktivität. Des Weiteren sind sie in der Lage, die Wirkung von Heparin und Antithrombin an Thrombin im gereinigtem System zu beeinflussen. Die Aptamer-Thrombin-Komplexe besitzten dabei im gereinigtem System eine Halbwertszeit von bis zu 4,5 Minuten (HD1-22) und im Blutplasma bis zu 30 Minuten (HD1-22). Im Plasma zeigte sich, dass die Aptamere die Thrombinaktivierung verzögern, aber durch den gleichzeitigen Schutz vor der AT-Inhibition eine Steigerung der gesamten Thrombinaktivität über die Zeit bewirken. Alle Effekte sind für das Fusionsaptamer HD1-22 deutlicher ausgeprägter als für seine Einzelbestandteile HD1 und HD22.

Dieser Ergebnisse verdeutlichen, dass eine exakte Charakterisierung der Aptamerwirkung auf alle Bindungspartner des Thrombins hin nötig ist, denn durch die Komplexität der Gerinnungskaskade kommt es zu einer Reihe von Überlagerungen einzelner Phänomene, die im gereinigtem System darzustellen sind, im physiologischen Kontext jedoch auf Grund der vielen beteiligten Faktoren und Verknüpfungen nicht eindeutig auseinanderzuhalten sind.

Im der nächsten Versuchsserie wird diese Komplexität deutlich, welche es nicht möglich macht, sicher die einzelnen Interaktionen zuzuordnen.

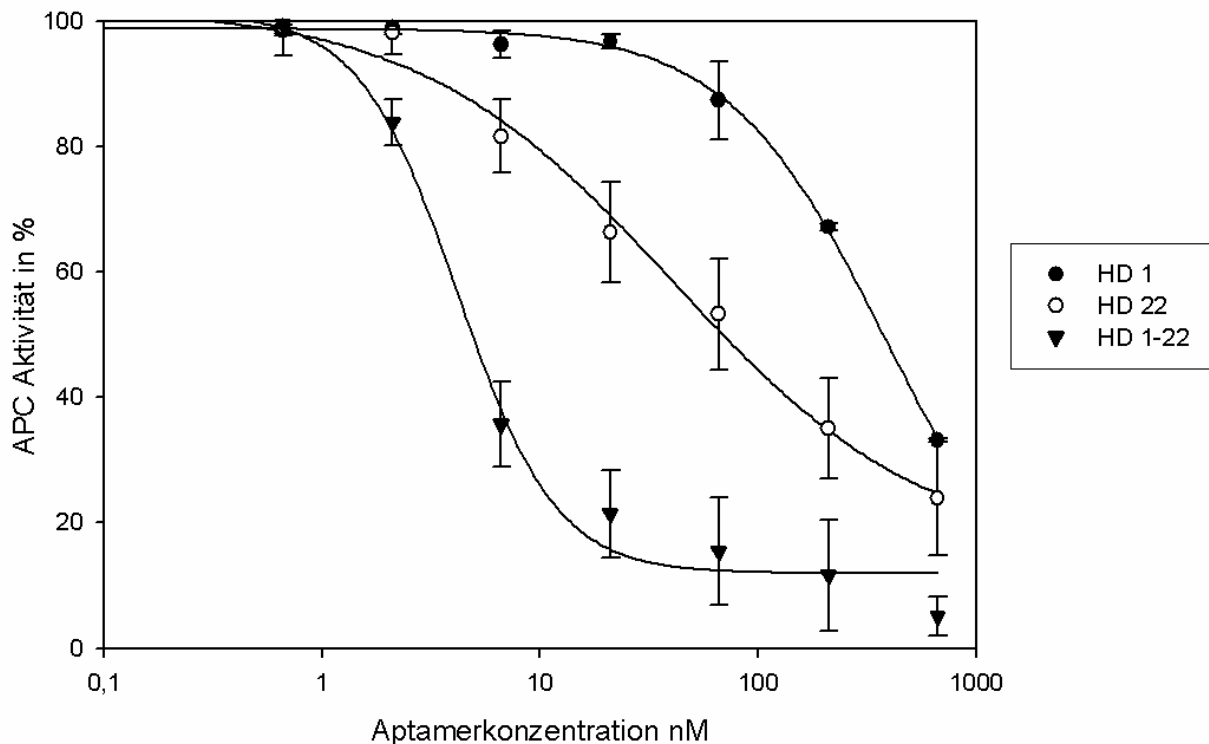
### 3.3 Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin im gereinigtem System

Im Weiteren sollte die Aptamerwirkung auf die Interaktion zwischen Thrombin und Thrombomodulin untersucht werden. Wie in den Versuchen mit AT wurden sowohl die Wirkung unterschiedliche Aptamerkonzentrationen als auch der zeitliche Verlauf der Interaktionen im gereinigtem System dargestellt. Zuletzt erfolgten TGA-Versuche, in denen die Parameter der TGA (lagtime, ttPeak, Peak, ETP, strat tail) in der An- und Abwesenheit von Thrombomodulin und den Aptameren in Poolplasma verglichen wurden.

#### 3.3.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss der Aptamere

In diesem Experiment sollte die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin und die Beeinflussung dieser Bindung durch die Aptamere über den Umsatz eines fluorogenen Substrates optisch im Fluorometer gemessen werden. Da Thrombomodulin jedoch nur ein Cofaktor ist und nicht

direkt ein Substrat spalten kann, muss ein Umweg gegangen werden. Protein C, welches durch einen Komplex aus Thrombin, Thrombomodulin, PI und  $\text{Ca}^{2+}$  zu APC aktiviert wird, kann in seiner aktiven Form das Substrat PEFA 5791 spalten, welches dann im Fluorometer gemessen werden kann. Das empfangene Signal ist also direkt abhängig zu der APC Aktivität. Da Protein C in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch den Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin aktiviert wird, kann man direkt Rückschlüsse auf die Bindung zwischen Thrombin und Thrombomodulin ziehen. Zwar kann das Substrat PEFA 5791 auch durch Thrombin gespalten werden, diese Möglichkeit wurde aber durch die Zugabe von Argatra verhindert, welches die amidolytische Aktivität des Thrombins inhibiert. Die Durchführung des Versuches wurde im Kapitel 2.2.4.1 beschrieben.



**Abb. 24:** Einfluss der Thrombinaptamere auf die Thrombin-Thrombomodulin-abhängige APC Generierung; Leerwert (0 nM Aptamere) gleich 100 %. Darstellung von Mittelwerten.

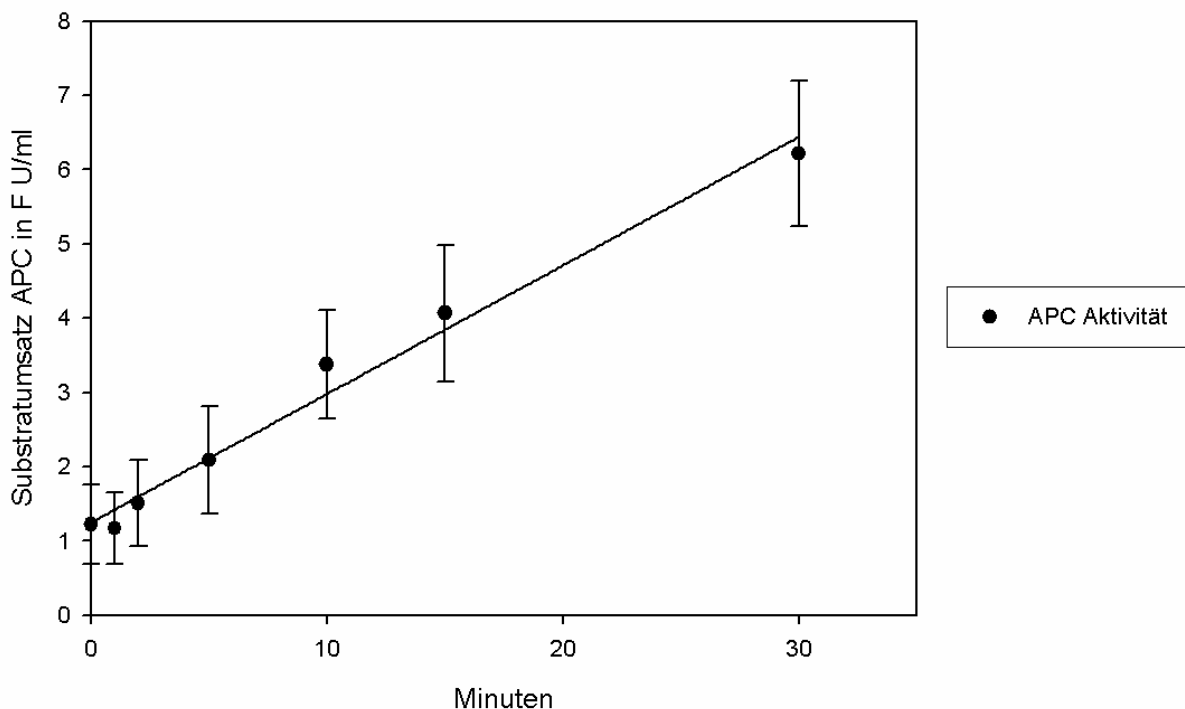
Wie die Abb. 24 zeigt, wird die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, gemessen anhand des Substratumsatzes von APC, von allen Aptameren unterschiedlich stark beeinflusst. HD1-22 zeigt eine sehr starke Inhibition, auch bei niedrigen Konzentrationen. Bei 666 nM können alle Aptamere die APC Aktivität und somit die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin auf unter 40 % (HD1) und sogar unter 5 % (HD1-22) senken. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die APC

Aktivität im Leerwert (0 nM Aptamere), der mit 100 % gleichgesetzt wurde. HD22 hat einen stärkern Effekt als HD1. Diese auffällige Tatsache war, wenn man die Bindung von Thrombomodulin an die Exosite 1 bedenkt, zunächst erstaunlich, jedoch lässt sie sich gut mit der Theorie der allosterischen Konformationsänderung zwischen den beiden Exosites erklären, wie in der Diskussion (Kap. 4.6.1) noch genauer ausgeführt werden wird. Der  $IC_{50}$  Wert lag für HD1 bei 382 nM, für HD22 bei 40 nM und für HD1-22 bei 4,17 nM.

### 3.3.2 Zeitabhängiger Einfluss der Aptamere

In diesen Versuchen sollte mit der gleichen Methode wie im Versuch 3.3.1 der zeitliche Verlauf der Protein C Aktivierung innerhalb der ersten 30 min untersucht werden. Die Durchführung wurde im Methodenteil 2.2.4.1 besprochen.

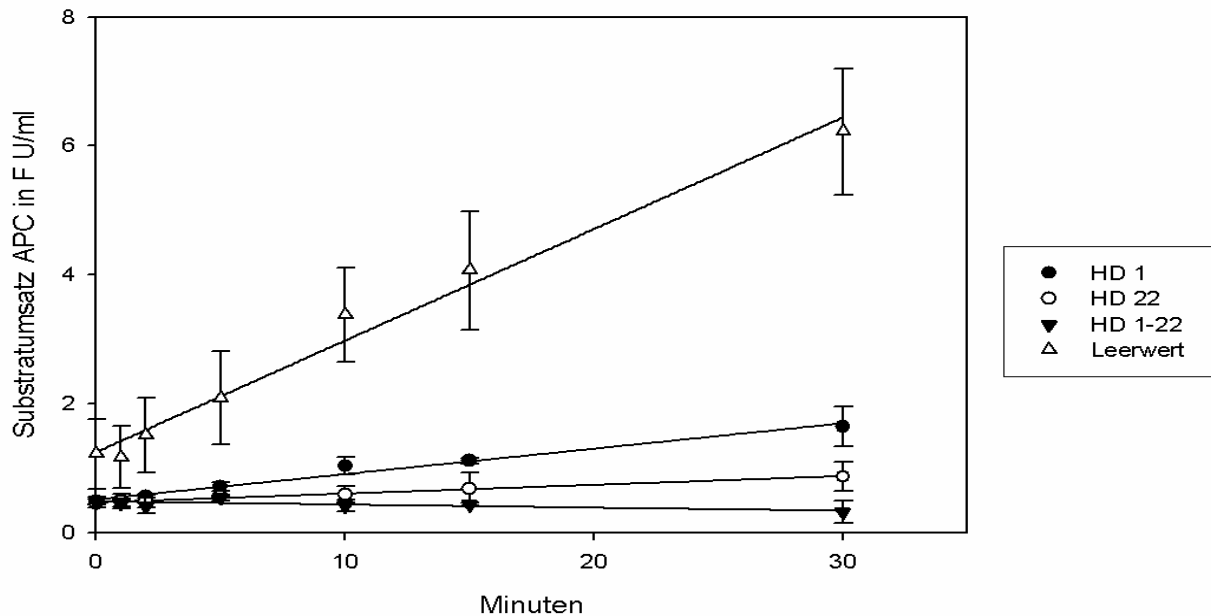
Versuchsergebnisse:



**Abb. 25:** Darstellung des Substratumsatzes durch aktiviertes Protein C in Abhängigkeit der Dauer der Protein C Aktivierung durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex. Darstellung von Mittelwerten.

Je länger Thrombin und Thrombomodulin zusammen Protein C aktivieren können, desto größer ist das von aktiviertem Protein C umgesetzte Signal. In Anwesenheit von den Aptameren (666

nM) wurde nun die Bindung von Thrombin an TM beeinflusst, was im folgenden Graphen dargestellt ist.



**Abb. 26:** Darstellung der Aptamerwirkung auf die Protein C Aktivierung in Abhängigkeit von der Zeit; Aptamerkonzentration (666 nM). Darstellung von Mittelwerten.

Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Aptamerwirkung bestätigen sich die Ergebnisse aus den konzentrationsabhängigen Versuchen (Kapitel 3.3.1). HD1 hat den geringsten Effekt auf die Protein C Aktivierung, zu sehen in einer Verdreifachung der Protein C Aktivität im Laufe von 30 Minuten. In Anwesenheit von 666 nM HD22 kommt es zu einer Verdopplung der APC Aktivität und HD1-22 vermag im Laufe von 30 Minuten seine inhibitorische Wirkung auf die APC Aktivierung aufrecht zu erhalten.

Nachdem auch für Thrombomodulin nachgewiesen werden konnte, dass die Aptamere im gereinigtem System die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin beeinflussen konnten, wurde in der nächsten Versuchsserie die Wirkung in defibrinisiertem Poolplasma untersucht.

### 3.3.3 Einfluss der Aptamere auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin in der Plasmamatrix

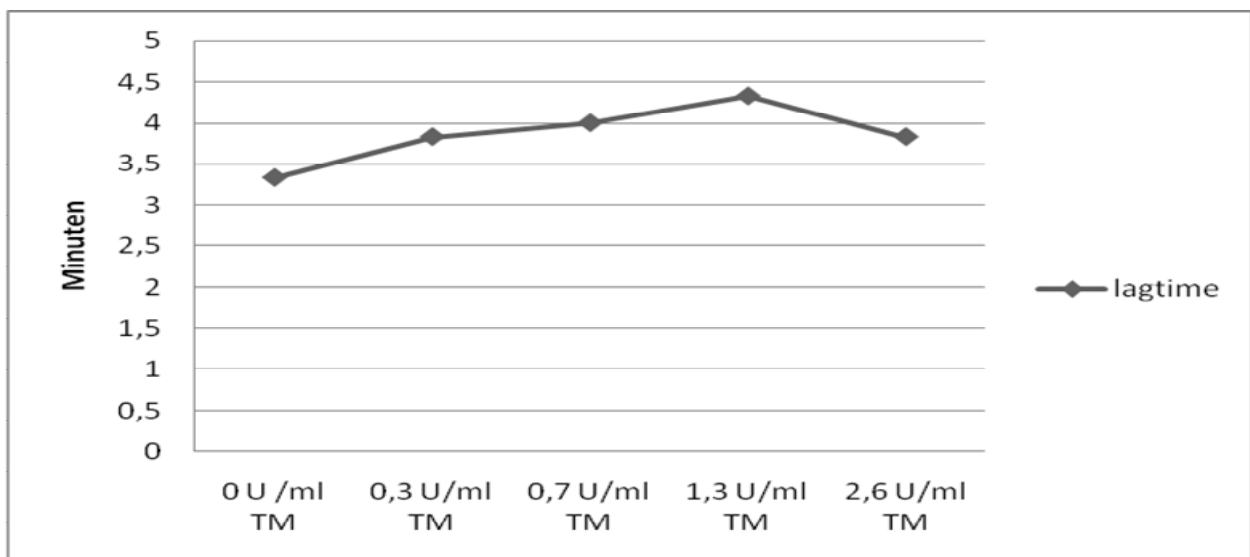
Mit Hilfe des Thrombingenerierungs Assays (TGA) sollte in diesen Experimenten die Auswirkung von Thrombomodulin auf die TGA-Parameter (ETP, Peak, ttPeak, start Tail und die lagtime) in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration untersucht werden. Thrombomodulin wirkt sich in diesem Testansatz über die Aktivierung von Protein C auf den positiven Feedbackmechanismus (Faktor V und VIII werden, in Zusammenarbeit mit Faktor S, inaktiviert) und über die beschleunigte Inaktivierung von Thrombin über PCI und AT aus (Pötzsch und Madlener, 2002). Das Versuchsprinzip des Thrombingenerierungsassays (TGA) wurde schon für die Antithrombinversuche erläutert (siehe Kap. 2.2.3.2).

In einen Vorversuch sollte die konzentrationsabhängige Wirkung von Thrombomodulin ohne die Aptamere untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Proben aus defibriniertem Poolplasma mit folgenden finalen Thrombomodulinkonzentrationen angesetzt:

$$2,6 \quad 1,3 \quad 0,7 \quad 0,3 \quad 0 \text{ [U/ml]}.$$

Diese wurden dann nach der beschriebenen Methode im Thrombioscope verglichen.

Abb. 27 bis Abb. 31 zeigt die Ergebnisse der 5 Parameter im TGA (ETP, Peak, ttPeak, start Tail und die lagtime):

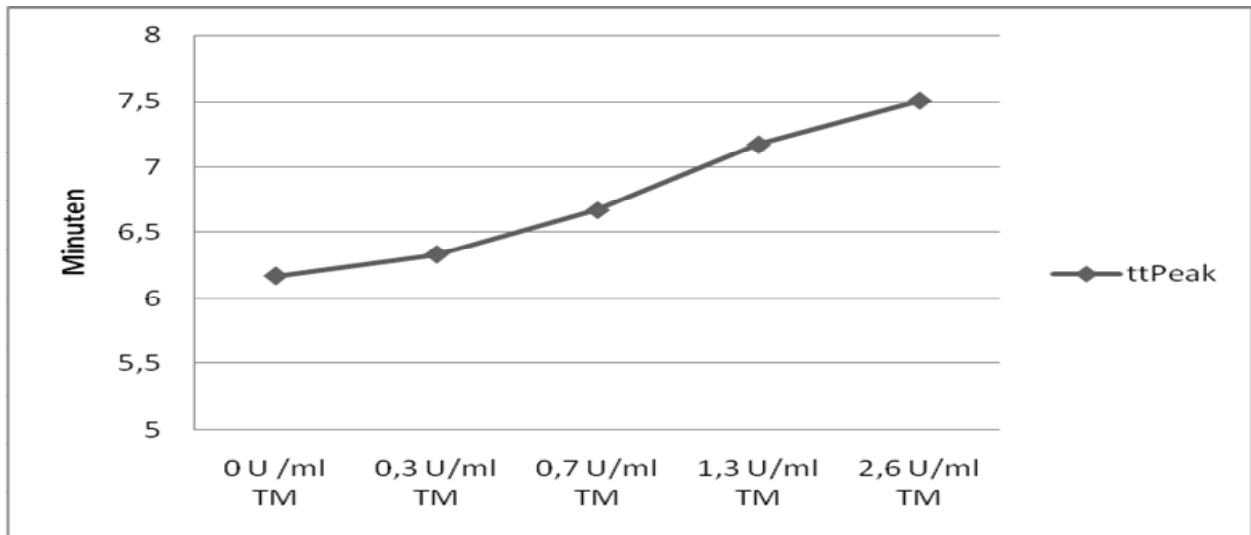


**Abb. 27:** Darstellung der konzentrationsabhängigen Thrombomodulinwirkung auf die lagtime im TGA. Darstellung von Mittelwerten.

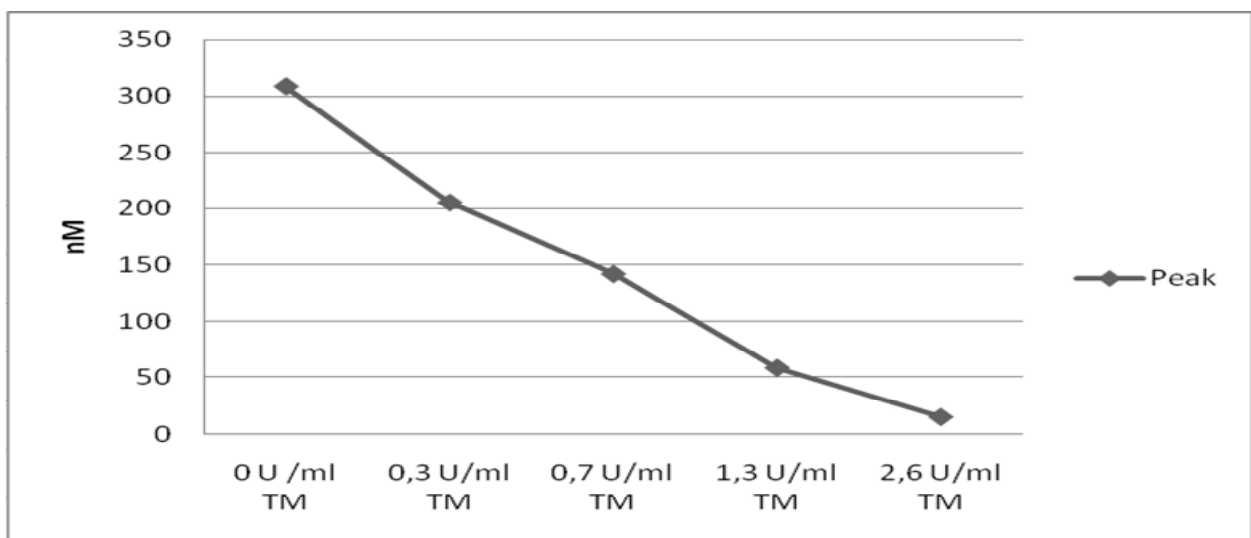
Wie in dieser Graphik (Abb.27) zu sehen ist, verlängert Thrombomodulin konzentrationsabhän-



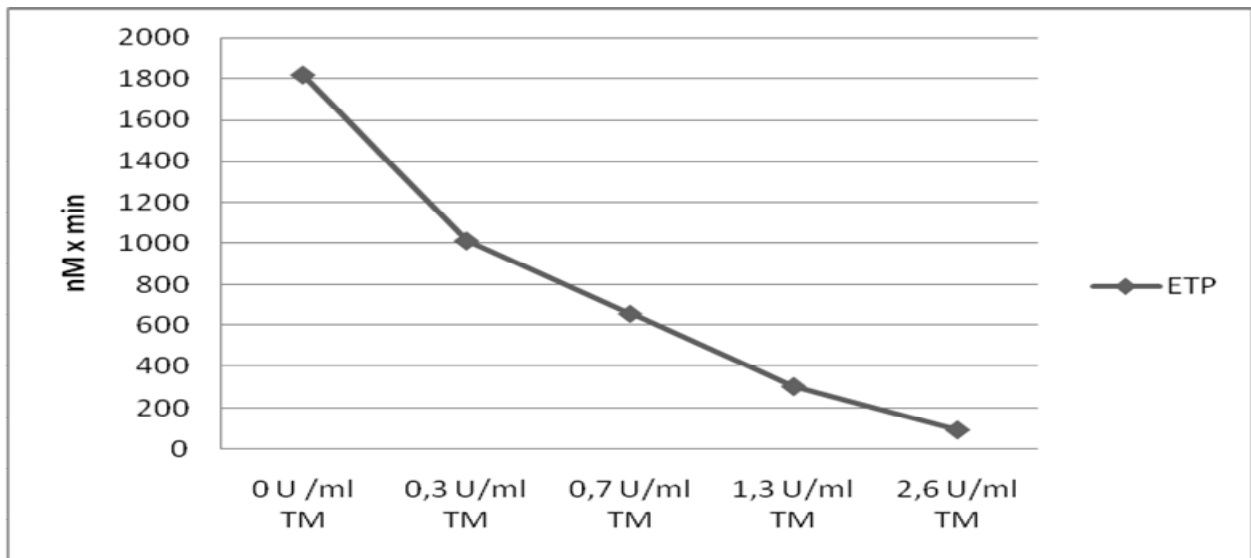
gig die lagtime. Es ist somit in der Lage, die Aktivierung des Thrombins über den negativen Feedback-Mechanismus (Protein C und S) zu verlangsamen. Die verlangsamt Thrombinaktivierung, wie schon für die lagtime gesehen, spiegelt sich auch in der tpeak wieder, allerdings nur mit einem geringem Effekt:



**Abb. 28:** Darstellung der konzentrationsabhängigen Thrombomodulinwirkung auf die tpeak im TGA. Darstellung von Mittelwerten.

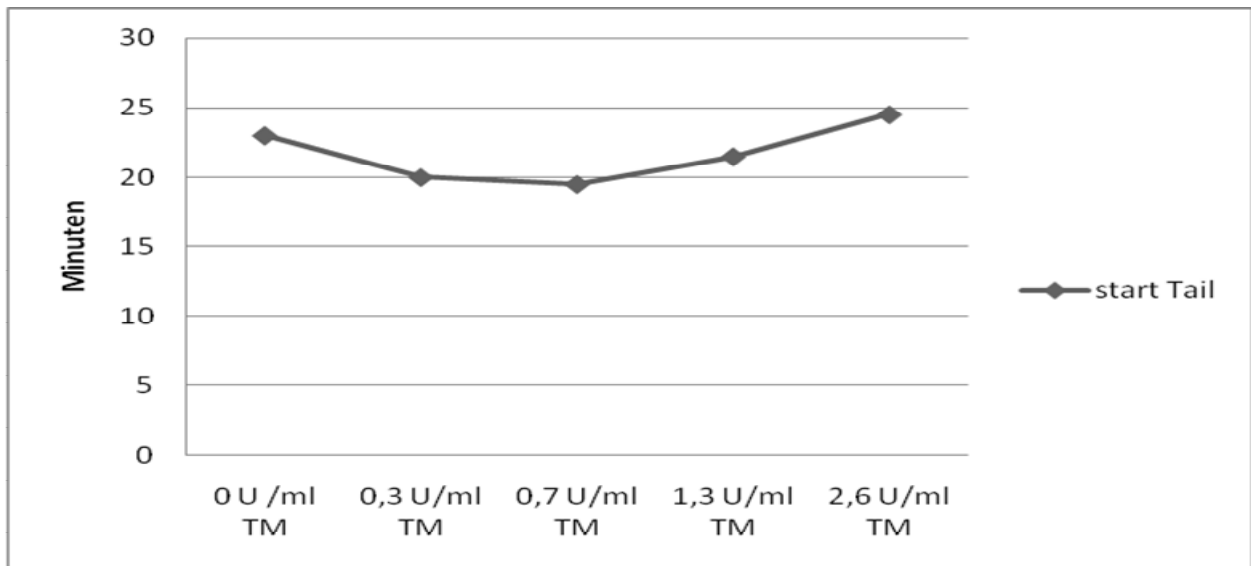


**Abb. 29:** Darstellung der konzentrationsabhängigen Thrombomodulinwirkung auf den peak im TGA. Darstellung von Mittelwerten.



**Abb. 30:** Darstellung der konzentrationsabhängigen Thrombomodulinwirkung auf das ETP im TGA. Darstellung von Mittelwerten.

Wie in Abb. 29 und 30 zu erkennen ist, hat Thrombomodulin deutliche Auswirkungen in dem TGA-Versuch auf den peak-Wert und das ETP. Es ist in der Lage, in hohen Konzentrationen die Aktivität von Thrombin fast vollständig zu inhibieren.



**Abb. 31:** Darstellung der konzentrationsabhängigen Thrombomodulinwirkung auf die start tail Zeit im TGA. Darstellung von Mittelwerten.

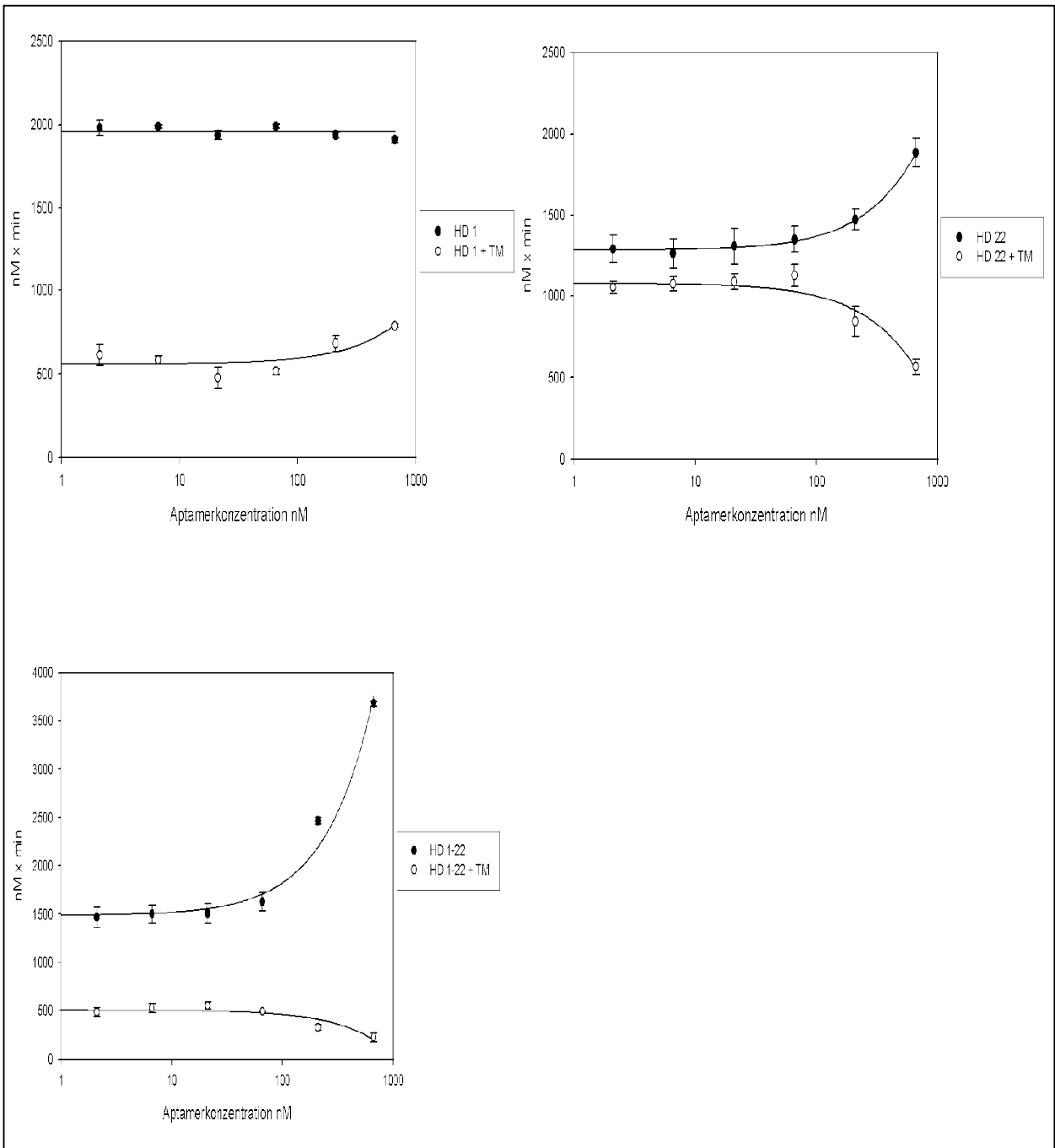
Geringfügige Auswirkung hat Thrombomodulin auf die start tail Zeit. Unter der Berücksichtigung, dass durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin die Inhibition

durch AT und Protein C 20 mal schneller verläuft als die Inhibition von freiem Thrombin (durch AT und Protein C), war dies nicht zu erwarten gewesen (*Pötzsch und Madlener, 2002*).

Aus den vorherigen dargestellten Versuchsergebnissen (Abb. 27 bis Abb. 31) lässt sich zusammenfassend sagen, dass Thrombomodulin die Thrombinaktivierung moderat verzögert und in der gesamten Aktivität deutlich inhibiert, bei gleichbleibender Gesamtdauer der Aktivität.

Eine Konzentration von 1,3 U/ml Thrombomodulin führt zu einer eindeutigen Veränderung des ETP und des Peaks (ohne diese vollständig zu inhibieren, wie höhere Thrombomodulinkonzentrationen es tun), deshalb kam diese Konzentration in den nächsten Experimenten zum Einsatz, um die Aptamerwirkung auf diese Thrombomodulineinflüsse darzustellen.

Es wurden zwei halblogarithmische Aptamerverdünnungsreihe angelegt, mit einer maximalen finalen Aptamerkonzentration von 666 nM. Eine Aptamerverdünnungsreihe erfolgte in defibriniertem Plasma und die zweite in defibrinisiertem Plasma mit 1,3 U/ml Thrombomodulin. Beide Ansätze liefen parallel mit dem Ziel, die einzelnen Wirkungen von Antithrombin und Thrombomodulin auf die Thrombingenerierung unterscheiden zu können.

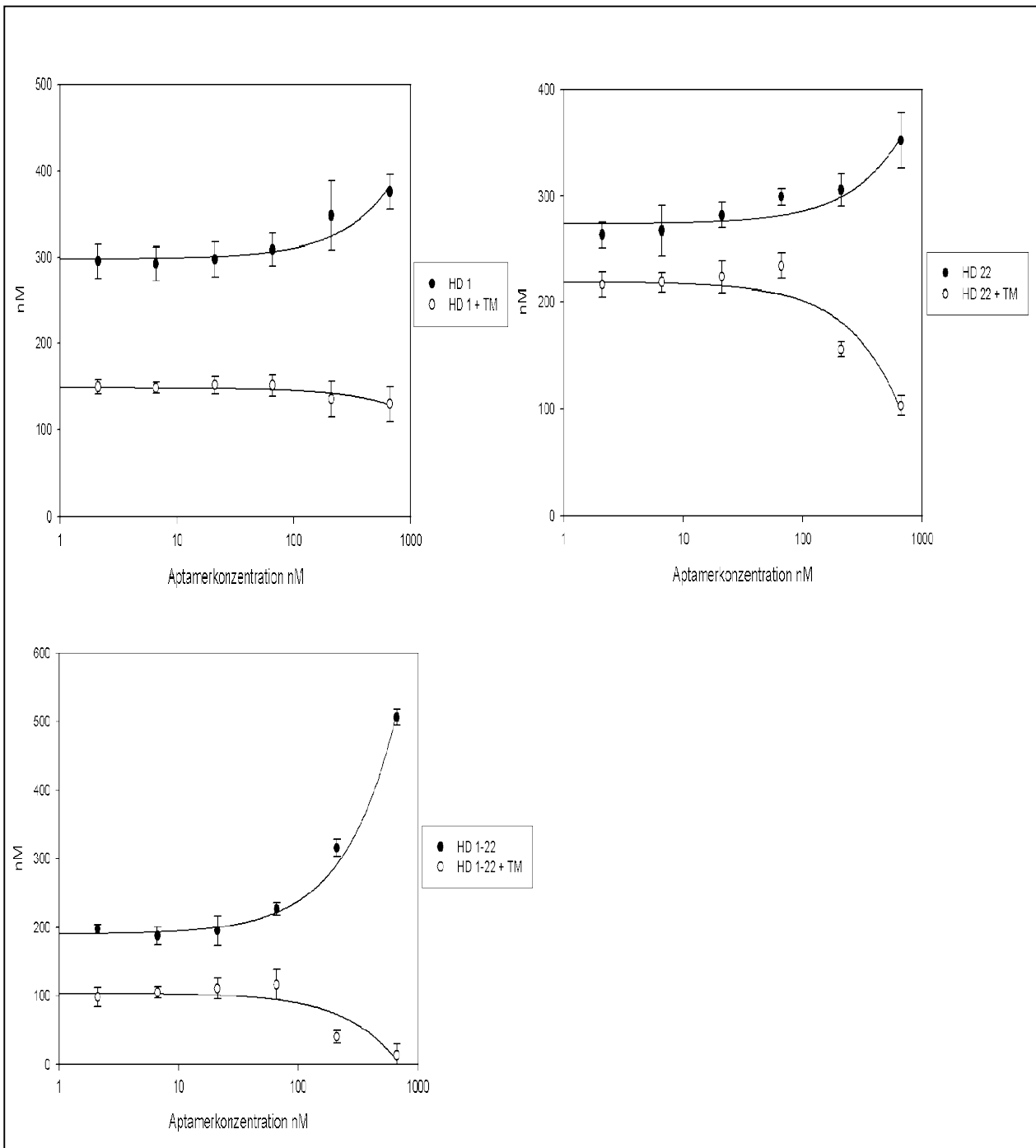


**Abb. 32:** Darstellung des ETP in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration im direkten Vergleich zwischen Plasma und mit 1,3 U/ml Thrombomodulin versetzten Plasma. Darstellung von Mittelwerten.

Auch diese Experimente zeigen noch einmal mit dem Anstieg des peaks und des ETP in reinem Plasma die verstärkende Wirkung der Aptamere durch den Schutz vor AT, wie schon in vorherigen Kapitel 3.2.4.1 beschrieben wurde. Das ETP ist, wie aus den Vorversuchen zu erwarten war, im Leerwert ohne Aptamere in Anwesenheit von Thrombomodulin um durchschnittlich 500 nM x

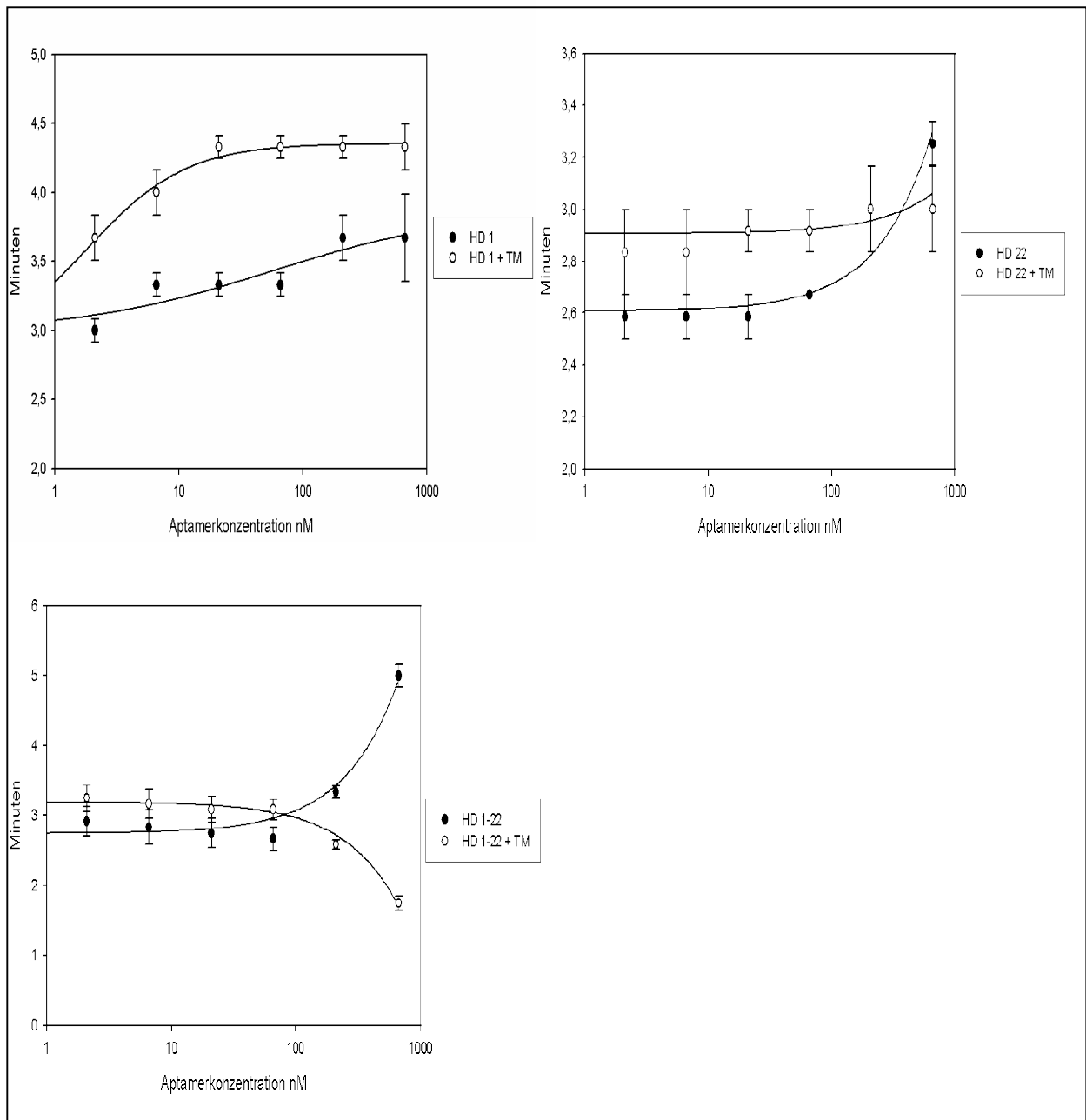
min geringer. Bei steigender Aptamerkonzentration mit Thrombomodulin gleicht sich diese Thrombomodulin-verursachte Aktivitätsminderung jedoch nicht aus. Basierend auf den Experimenten im gereinigtem System (siehe Kap. 3.3.1) hätte man eigentlich erwarten können, dass die Aptamere die Thrombomodulinwirkung inhibieren und es zu einem Angleich der Aktivität mit den Werten in reinem Plasma kommen würde. Aber die Aptamere verstärken den inhibitorischen Effekt des Thrombomodulin, so dass das ETP bei HD22 von 1000 auf unter 600 nM x min fällt und HD1-22 sogar auf unter 250 nM x min senkt. HD1 wirkt sich in großen Konzentrationen nicht auf das durch Thrombomodulin verringerte ETP aus.

Die Aptamere blockieren also nicht die thombomodulininduzierte Hemmung von Thrombin, wie aus dem Experiment 3.3.1. zu erwarten war, sondern verstärken den Effekt der Inhibition. Zunächst sind in Abb. 32 bis 34 die absoluten Werte dargestellt, während in Abb. 35 bis 37 die Versuchsergebnisse in Relation zum Leerwert dargestellt sind.



**Abb. 33:** Darstellung des peaks in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration im direkten Vergleich zwischen Plasma und mit 1,3 U/ml Thrombomodulin versetzten Plasma. Darstellung von Mittelwerten.

Ein ähnlicher Effekt wie für das ETP ist auch für den peak-Wert zu sehen. Die Aptamere verstärken in hohen Konzentrationen die Thrombomodulinwirkung. Dabei fällt der peak bei 666 nM HD22 auf die Hälfte des Ausgangswertes (von 200 nM auf 100 nM) und bei HD1-22 sogar um eine Zehnerpotenz (von 100 nM auf 10 nM).

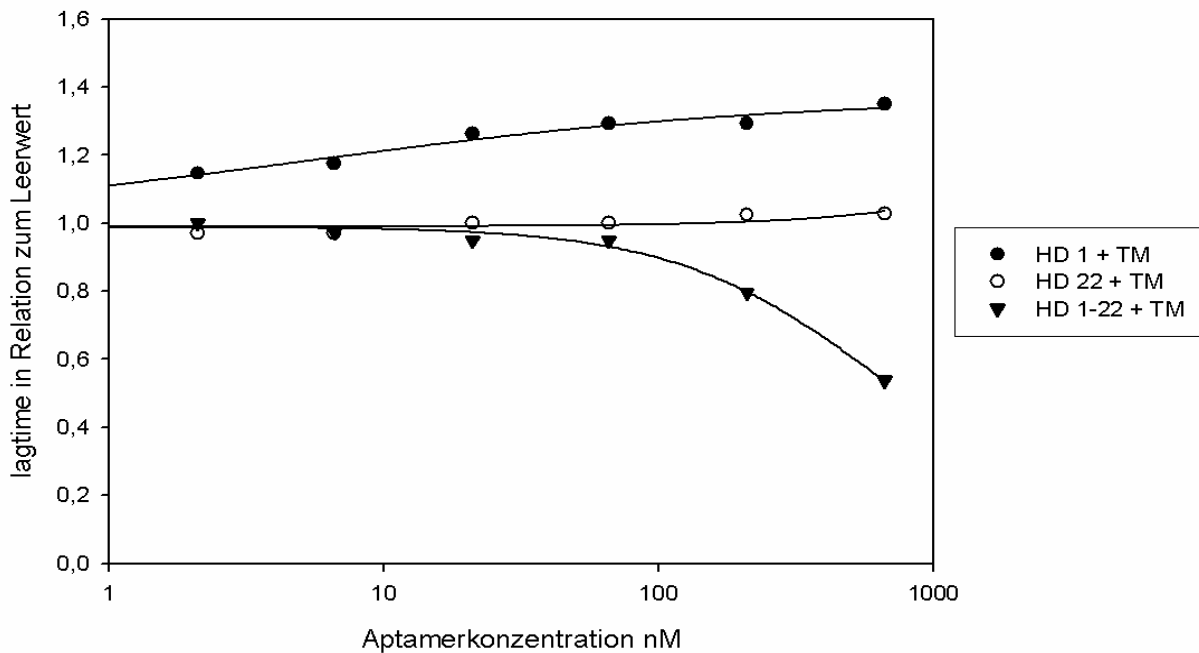


**Abb. 34:** Darstellung der lagtime in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration im direkten Vergleich zwischen Plasma und Plasma mit 1,3 U/ml Thrombomodulin. Darstellung von Mittelwerten.

Aus diesen Graphiken ist ersichtlich, dass die lagtime in reinem defibrinisiertem Plasma in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration steigt. Dieser Effekt war auch schon im Experiment unter Kapitel 3.2.4.1 dargestellt. In Anwesenheit von Thrombomodulin ist die lagtime etwas erhöht und liegt über den Leerwert (ohne Aptamere) im Plasma. HD1 und HD22 verändern die lagtime in Anwesenheit von Thrombomodulin nur unwesentlich. Deutlich ist jedoch die Verkürzung der lagtime in Anwesenheit von hohen HD1-22 Konzentrationen auf einen Wert, der deut-

lich unter dem Leerwert liegt: 1,7 min (66 nM) im Vergleich zu 3,25 min im Leerwert. HD1-22 beschleunigt also in hohen Konzentrationen (in Anwesenheit von Thrombomodulin) die Thrombinentstehung. Dies ist, auf den ersten Blick, die logische Konsequenz aus der Tatsache, die in den Experimenten unter Kapitel 3.3.1. schon beschrieben wurde. HD1-22 blockiert die lagtime verlängernde Thrombomodulinwirkung. Mit der Inhibition von Thrombomodulin durch HD1-22 ist jedoch nicht zu erklären, dass die lagtime sogar kürzer als im Leerwert oder auch im reinen Plasma ist.

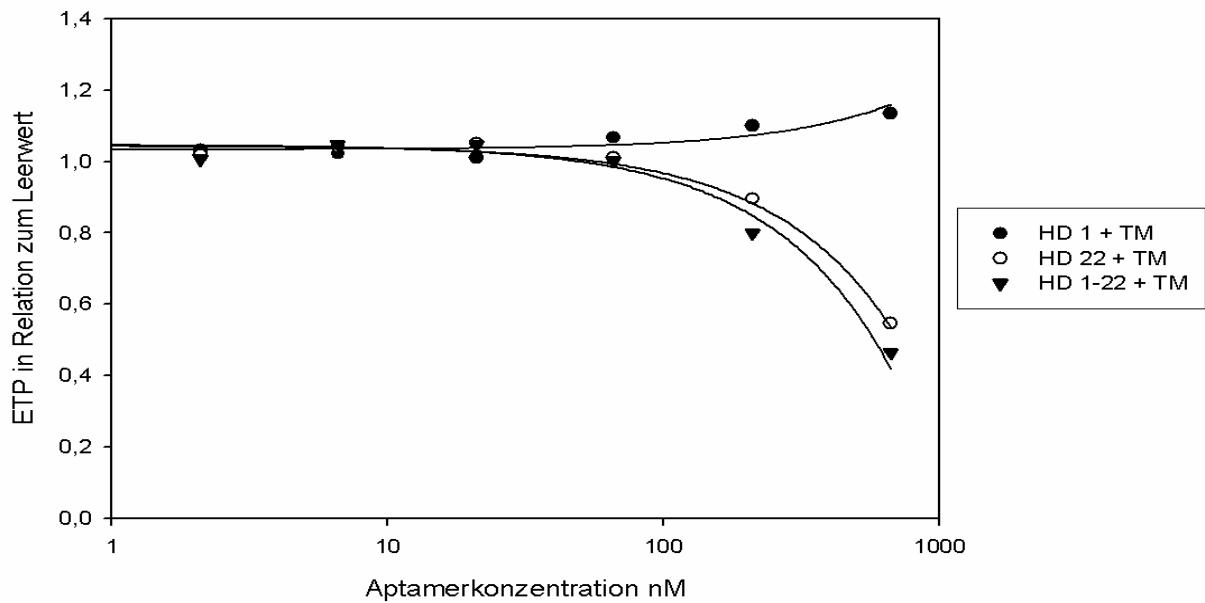
Nachfolgend sind noch einmal die lagtime, das ETP und der peak für die Aptamerverdünnungsreihe im Plasma mit Thrombomodulin dargestellt, dabei ist der Leerwert gleich 1 gesetzt:



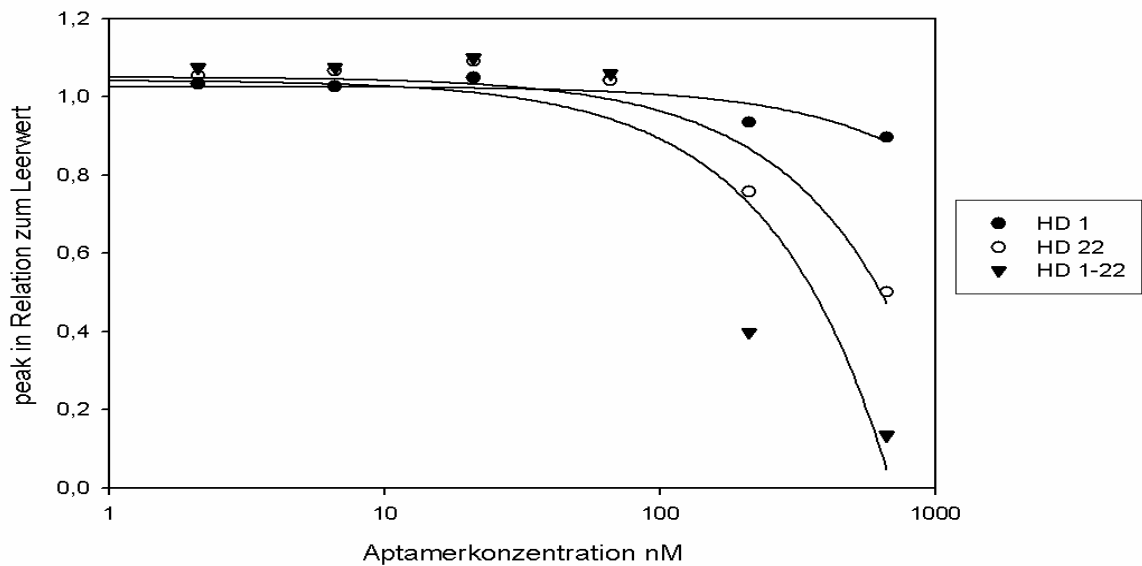
**Ab**

**Abb. 35:** Darstellung der lagtime in Relation zum Leerwert (Leerwert ohne Aptamere gleich 1 gesetzt) in Abhängigkeit der Aptamerkonzentrationen und in Anwesenheit von 1,3 U/ml Thrombomodulin. Darstellung von Mittelwerten.





**Abb. 36:** Darstellung des ETP in Relation zum Leerwert (Leerwert ohne Aptamere gleich 1 gesetzt) in Abhängigkeit der Aptamerkonzentrationen und in Anwesenheit von 1,3 U/ml Thrombomodulin. Darstellung von Mittelwerten.



**Abb. 37:** Darstellung des peaks in Relation zum Leerwert (Leerwert ohne Aptamere gleich 1 gesetzt) in Abhängigkeit der Aptamerkonzentrationen und in Anwesenheit von 1,3 U/ml Thrombomodulin. Darstellung von Mittelwerten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

Die Aptamere HD1 und HD22, welche an die Exosite 1 bzw. Exosite 2 binden können, sowie das Fusionsaptamer HD1-22, welches an beide Exosites binden kann, sind in der Lage, die Thrombinaktivität zu beeinflussen (siehe Kapitel 3.1.). Diese Wirkung wurde von einer Reihe von Arbeitsgruppen bewiesen (*Bock et al., 1992; Müller et al., 2007; Tasset et al., 1997*). Die Stärke dieser Inhibition beruht auf der Affinität und der Bindungsstelle am Thrombin. So ist die Affinität von HD1-22 gegenüber HD1 10-mal stärker und gegenüber HD22 4-mal so stark (*Müller et al., 2008*).

In dem Experiment im Kapitel 3.1 (Einfluss der Aptamere auf die amidolytische Thrombinaktivität) konnte auch ein Abfall der amidolytischen Aktivität von Thrombin durch die Anwesenheit der Aptamere dargestellt werden. Die Fähigkeit, die amidolytische Thrombinaktivität zu beeinflussen, konnte bei einer Reihe von synthetischen und physiologischen Stoffen, die an die beiden Exosites binden, beobachtet werden (*Duffy et al., 1997; Liu et al., 1991; Pospisil et al., 2003; Verhamme et al., 2002*). In neueren Veröffentlichungen konnte jetzt gezeigt werden, dass die Bindungen an den Exosites zu allosterischen Konformationsänderungen innerhalb des Thrombinmoleküls führen, welche sich von den Exosites auf das Aktive Zentrum auswirken, aber auch zwischen den beiden Exosites vorherrschen (*Di Cera, E. 2008; Petrera et al., 2009; Pineda et al., 2004; Sabo et al., 2006*). Die Aptamere wirken also nicht, wie zu erwarten gewesen ist, nur auf die Bindungspartner der gleichen Exosite, sondern können sowohl auf das Aktive Zentrum als auch auf die gegenüberliegenden Exosite Einfluss nehmen.

Die Aptamere wirken also in erster Linie über eine Blockierung der Exosite-vermittelten Bindung der Gerinnungsfaktoren und darüber hinaus durch eine Konformationsänderung innerhalb des Zielmoleküls Thrombin. Diese molekulare Strukturänderung wird im nächsten Kapitel diskutiert.

### 4.2 Inhibition der amidolytischen Thrombinaktivität

Eine mögliche Erklärung für die Beeinflussung des Aktiven Zentrums durch eine Anlagerung an den Exosites besteht in der Induktion einer allosterischen Umlagerung innerhalb des Thrombinmoleküls, die sich zwischen den beiden Exosites und zwischen den Exosites und dem Aktiven

Zentrum auswirkt, wodurch die Bindungsfähigkeit des Thrombins mit anderen pro- und antikoagulatorischen Stoffen als auch die amidolytische Aktivität direkt beeinflusst wird. Eine allosterische Umlagerung innerhalb des Thrombins ist bis jetzt für die Bindung von PAR1 (protease-activated receptor) an der Exosite 1 mittels Crystallographischen Methoden nachgewiesen, welche ein Wegdrehen eines surface loops aus dem Aktiven Zentrum bewirkt (*Gandhi et al., 2008*). Darüber hinaus ist der Mechanismus der gegenseitigen Beeinflussung der Exosites und der Beeinflussung des Aktiven Zentrums noch nicht geklärt, es gibt jedoch eine Reihe von strukturellen und funktionellen Beobachtungen, die die Theorie der allosterischen Umlagerung stärken. Diese sollen im folgenden Abschnitt kurz dargestellt werden.

Es ist nachgewiesen, dass eine allosterische Verbindung zwischen Exosite 1 und der Na<sup>+</sup> Bindungsstelle besteht (*Di Cera, 2008; Pineda et al., 2004*). Na<sup>+</sup> ist ein allosterischer Effektor, der die proagulatorische und antikoagulatorische Funktion des Thrombins beeinflusst. Eine allosterische Verbindung kann über eine Reihe von Tryptophan-Aminosäuren im Inneren des Thrombinmoleküls nachgewiesen werden, welche die Exosite 1 mit der Na<sup>+</sup> Bindungsstelle verbinden. Eine Verbindung zwischen der Na<sup>+</sup> Bindungsstelle, dem Aktiven Zentrum und der Exosite 2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (*Petrera et al., 2009*). In einer Untersuchung der kristallinen Struktur des Thrombinmoleküls konnte bei der Anlagerung von gamma-Peptiden an die Exosite 2 zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen an einer Tasche in der unmittelbaren Nähe der Na<sup>+</sup> Bindungsstelle nachgewiesen werden (*Pineda et al., 2007*). Diese gamma-Peptide sind anionische Fragmente einer Fibrinogenvariante, die mit hoher Affinität an Thrombin binden. Da die Na<sup>+</sup> Bindungsstelle einen globalen Effekt auf die Thrombinstruktur hat, ist davon auszugehen, dass das allosterische Zentrum und die Na<sup>+</sup> Bindungsstellen auch durch Liganden der Exosite 2 moduliert werden können (*Di Cera, 2008*). Ein weiteres Argument für die allosterische Verbindung zwischen den Exosites zeigen NMR (Nuclear magnetic resonance) Studien, in denen die Bindung durch gamma-Peptide an Exosite 2 die Exosite 1 modifizieren (*Sabo et al., 2006*).

Ein weiterer Beweis für die allosterische Verbindung zwischen Exosite 1 und 2 konnte mit Hilfe von funktionellen Tests für folgende Liganden erbracht werden: Heparin, F2 (ein RNA Aptamer) (*Carter et al., 2005; Long et al., 2008*) und HD22, siehe Abb. 11 und (*Müller et al. 2008; Petrera et al., 2009*), die alle die Bindungseigenschaften der Exosite 1 beeinflussen können.

In dieser Arbeit konnte nun die verminderte Bindung von Thrombomodulin an die Exosite 1

durch die Anlagerung von HD22 an Exosite 2 beschrieben werden (siehe Abb. 24). Petrera konnte mit dem RNA Aptamer F2 zeigen, dass eine Bindung dieses Aptamers an der Exosite 2 eine Abspaltung eines Hirudin-abgewandelten Peptids von der Exosite 1 bewirkt (*Petrera et al., 2009*).

Beweise, dass diese allosterische Modulation auch in umgekehrte Richtung funktioniert, nämlich von Exosite 1 zu der Exosite 2, ergibt sich aus den im Kapitel 3.2.2 (Abb. 11) dargestellten Experimenten, bei denen HD1 in der Lage war, die AT-vermittelte Inhibition der amidolytischen Thrombinaktivität, die durch Heparin, welches an der Exosite 2 bindet, beschleunigt wird, um 17 % zu blockieren. Des Weiteren beschreibt Pospisil eine Reduktion der Fähigkeit, gamma-Peptid an Exosite 2 zu binden, wenn Liganden an die Exosite 1 binden (*Pospisil et al., 2003*).

Die Möglichkeit, dass die Aptamere mit ihrer Bindung an einer Exosite die Anlagerung an das Aktive Zentrum oder die gegenüberliegenden Exosite durch ihre räumliche Struktur behindern und nicht über eine intramolekulare Konformationsänderung, ist durch die bisherigen funktionellen und strukturellen Untersuchungen als unwahrscheinlich anzusehen (*Kim et al. 2008; Petrera et al., 2009; Pineda et al. 2007*).

Die Blockierung der Exosites durch die Anlagerung der Aptamere behindert einerseits also die Bindungspartner des Thrombins, andererseits beeinflusst sie aber auch die amidolytische Aktivität. Dies müsste sich eigentlich auch in einem Thrombingenerierungs Assay auswirken, indem es zu einem Abfall des ETP in Anwesenheit der Aptamere kommt. Das ETP stellt hier einen Wert für die Thrombingenerierung und Aktivität des Thrombins über einen bestimmten Zeitraum dar. Die zu erwartenden hemmenden Effekte der Aptamere, die in einem Abfall des ETP zu sehen wären, bleiben aber, wie in Kapitel 3.2.4.1 gezeigt wird, aus und es kommt sogar zu einem Anstieg des ETP um das 3,4-fache in der Anwesenheit von HD1-22.

Die TGA Experimente wurden im Plasma durchgeführt. Da es im Plasma eine Reihe von Faktoren gibt, die sowohl proagulatorisch, wie zum Beispiel Faktor Va und VIIIa, als auch antikoagulatorisch (Antithrombin, Heparin-Kofaktor II) auf Thrombin wirken, ist die naheliegende Erklärung, dass die Aptamere die Wirkung dieser Faktoren an Thrombin beeinflussen. Da die Aptamere die Bindungsstelle (Exosite 1 und 2) der meisten Faktoren blockieren (*Adams, 2006; Kretz, 2006*), ist die einzige Möglichkeit der ETP Steigerung in einer Blockade der antikoagulatorischen Faktorenwirkung auf Thrombin zu sehen. An erster Stelle ist hier Antithrombin als irre-

versibel hemmender Gegenspieler zu nennen (*Pike et al., 2005*). Dass die Blockade der irreversiblen AT-Hemmung durch die Aptamere für die ETP-Verlängerung und peak-Erhöhung verantwortlich ist, soll in den nächsten Kapiteln beschrieben und diskutiert werden.

### 4.3 Die modulierende Aptamerwirkung auf die Antithrombin-Thrombin Interaktion

#### 4.3.1 Blockierung der AT Inhibition

Antithrombin interagiert mit dem Aktiven Zentrum des Thrombins und führt so letztlich zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms. AT wirkt dabei wie ein Pseudosubstrat, welches zunächst von der Serinprotease als Substrat erkannt wird und so reversibel mit dem Aktiven Zentrum in Kontakt tritt. Für die Erkennung des Substrates und der Interaktion am Aktiven Zentrum ist der „reactive site loop“ (RSL) des AT verantwortlich. Durch die nun folgende Spaltung einer Aminosäuresequenz innerhalb des RSL des AT-Moleküls wird AT in einem sogenannten Michaelis-komplex fixiert. In einem zweiten Schritt entsteht dann eine kovalente Esterbindung zwischen beiden Molekülen (*Pike et al., 2005*). In den Experimenten unter Kapitel 3.2.2, (Abb. 9) ist zu erkennen, dass der inhibitorische Effekt des AT vorwiegend in Anwesenheit der Aptamere geschwächt wird und 10 nM HD1-22 in der Lage ist, eine Steigerung der verbleibenden amidolytischen Thrombinaktivität von 30 % in dem beschriebenen Testansatz zu erreichen.

Die Fähigkeit der Aptamere, die AT-Bindung an Thrombin zu beeinflussen, obwohl sie unterschiedliche Bindungsstellen innerhalb des Moleküls besitzen, leitet sich aus den oben beschriebenen allosterischen Veränderungen innerhalb des Thrombinmoleküls her. Die allosterischen Umlagerungen beeinflusst also nicht nur die amidolytische Aktivität im Aktiven Zentrum, sondern auch die Bindung des Aktiven Zentrums mit anderen Molekülen. Dabei sind die Effekte an der Exosite 1 durch HD1 geringer ausgeprägt. In Kombination mit den Ergebnissen aus den Experimenten unter Kapitel 3.1, in denen HD1 das Aktive Zentrum in seiner amidolytischen Funktion geringer beeinflusst als HD22, liegt die Vermutung nahe, dass das Aktive Zentrum stärker durch die Bindung eines Liganden an die Exosite 2 beeinflusst wird als dies bei einer Bindung an Exosite 1 der Fall ist. Dies trifft sowohl für die amidolytische Aktivität als auch für die Bindungsfähigkeit des AT am Aktiven Zentrum zu.

Eine weitere Erklärung für die überlegene Wirkung von HD22 gegenüber HD1 könnte sich aus

der Vermutung von Müller et al. ergeben: 2008 interpretierten sie die Blockierung der AT Wirkung an Thrombin (durch die Aptamere) als eine direkte Beteiligung der Exosite 2 an der Bindung von AT an Thrombin. Hier würde HD22 also nicht über eine allosterische Konformationsänderung die AT Inhibition an Thrombin beeinflussen, sondern über eine direkte Blockade der Exosite 2 (Müller et al., 2008).

#### 4.3.2 Die Rolle des Heparins

Unfraktioniertes Heparin bindet an die Exosite 2 von Thrombin (Adams, 2006) und verstärkt die AT Wirkung um das 1000-fache, indem es die Komplexbildung unterstützt (Nutescu et al., 2008). Diese Komplexbildung wird durch zwei Mechanismen bewirkt: Erstens bindet Heparin an AT und induziert eine Konformationsänderung, bei der der RSL des AT besser zugänglich für das Aktive Zentrum des Thrombins wird und zweitens kann Heparin über einen Template Mechanismus eine direkte molekulare Brücke zwischen Thrombin und AT bilden. In dem Experiment in Kapitel 3.2.2. (siehe Abb. 11) wurde deutlich die überlegene Wirkung von HD1-22 gegenüber der von HD1 und HD22 dargestellt; hier zeigte sich eine Steigerung der verbleibenden amidolytischen Thrombinaktivität von bis zu 90 %. HD22 kann, mit der Blockade der Exosite 2, die AT verstärkende Heparinwirkung um über 80 % aufheben. Die Überlegenheit von HD1-22 ergibt sich aus der direkten Bindung der HD22-Domäne an Exosite 2, welche die Heparinbindung beeinflusst und der im Vergleich zu HD22 höheren Bindungsaffinität an Thrombin. HD1 führt in Anwesenheit von Heparin ebenfalls zu einer Steigerung der verbleibenden amidolytischen Thrombinaktivität (siehe Abb. 8 und Abb. 11). Wie in Abb. 8 zu sehen ist, beträgt diese Aktivitätssteigerung ohne Heparin etwa 5 %, wohingegen in Anwesenheit von Heparin etwa 20 % mehr Aktivität (im Vergleich zum Leerwert ohne Aptamere) erreicht werden kann (Abb. 11). Obwohl HD1 also an der Exosite 1 bindet, ist es trotzdem in der Lage, die durch Exosite 2 vermittelte Heparinwirkung zu modulieren. Dies könnte ein Hinweis für die allosterische Konformationsänderung, ausgehend von Exosite 1 auf Exosite 2, sein, welche die Heparinbindung verhindert. Die modulierende Wirkung auf die Exosite 2 durch die Bindung an die Exosite 1 ist auch schon für die verminderte Bindung von gamma-Peptiden an der Exosite 2 in Anwesenheit von Exosite 1 Liganden bewiesen worden (Pospisil, 2003). Dies wäre ein weiterer Hinweis für eine intramolekulare Verbindung zwischen den Exosites, die sowohl von Exosite 2 auf Exosite 1 wirkt, wie auch in umgekehrter Richtung.

### 4.3.3 Die Rolle der Phospholipide

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde nun das Puffersystem um eine Komponente erweitert, um so den physiologischen Begebenheiten näher zu kommen. Phospholipide sind wichtige Kofaktoren, die für die Bindung der Gerinnungsfaktoren und die Komplexbildung (z.B. Exogene Tenase) von Bedeutung sind; so werden sie zum Beispiel von aktivierten Thrombozyten sezerniert, binden  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen und sorgen so für eine Konzentrierung der Gerinnungsfaktoren am Ort der Endothelschädigung (*Morrissey, 2001*). Aber auch die Bindungseigenschaften der Aptamere HD1 und HD1-22 an Prothrombin werden durch die PL verbessert (*Müller et al., 2008*). Wie aus dem Experiment, dargestellt unter Kapitel 3.2.2 (siehe Abb. 10), ersichtlich wird, haben die PL auf die AT Blockierung durch die Aptamere keinen großen Einfluss. Ist jedoch Heparin an der Thrombininhibition beteiligt, zeigte die Anwesenheit von PL im Reaktionsansatz auffällige Unterschiede (siehe Abb. 13) im Vergleich zu den Testansätzen ohne PL. Die PL verstärken die heparinunterstützte AT Wirkung, was in einem Aktivitätsabfall des Thrombins im Experiment zu erkennen ist. Da dieser Effekt ohne Heparin nicht ausgeprägt zu erkennen war, müssen also die PL die Heparineigenschaften verstärkend beeinflussen. Ein weiterer Hinweis, dass die Heparinwirkung durch PL beeinflusst wird, beschrieben auch Walker und Esmon. Sie konnten zeigen, dass die hemmende Wirkung von Heparin auf die Prothrombinaktivierung in Abwesenheit von PL nicht stattfindet. Heparin ist also in der hemmenden Wirkung der Prothrombinaktivierung auf PL angewiesen (*Walker und Esmon, 1979*). Es ist aber mit der durchgeführten Versuchsreihe nicht eindeutig zu erklären, ob die Phospholipide die Bindungsfähigkeit von Heparin an Thrombin verbessern oder die PL zu einer verbesserten Interaktion zwischen Heparin und AT beitragen.

### 4.4 Zeitabhängige Aptamerwirkung

Müller et al. konnten nachweisen, dass die Verbesserung der Affinität des Fusionsaptameres in erster Linie durch die kleinere off-rate zustande kommt (*Müller et al., 2008*). Diese off-rate ist bei HD1-22 rund zehnmal kleiner als bei HD1 und zweimal kleiner als bei HD22. HD1-22 hat außerdem eine zweifach höhere on-rate als HD22 und etwa dieselbe on-rate wie HD1. Ein Grund für die bessere Wirkung des Fusionsaptamers liegt also in der längeren Bindungszeit, die das Aptamer mit Thrombin eingeht, bevor es wieder abdissoziiert. Zur Ermittlung der on- und off-rate verwendeten Müller et al. das surface plasmon resonance (SPR) Verfahren (*Müller et al., 2008*).

In dem Versuch unter Kapitel 3.2.3. (Aptamer-vermittelte Blockierung der Inhibition von

Thrombin in Abhängigkeit der Zeit), konnte dieser Effekt in einem funktionellen Test bestätigt werden. Hier zeigte sich die Auswirkung der geringeren off-rate durch eine Verlängerung des Zeitintervalls, in dem die Aptamere einen Effekt auf die Blockierung des AT haben. HD1-22 kann zehnmal länger als HD1 und doppelt so lange wie HD22 die AT-Wirkung blockieren. Insgesamt konnten 60 nM HD1-22 bei einer HWZ von 4,5 Minuten die AT Wirkung 20 Minuten beeinflussen. Auch im Plasma ist die Stabilität der Aptamer-Thrombin Komplexe im zeitlichen Verlauf darstellbar und bestätigt die Ergebnisse aus den SPR Versuchen: Im TGA Versuch unter Kapitel 3.2.4.1 ist die kleine off-rate des HD1-22 verantwortlich für die Verlängerung der start tail Zeit und ermöglicht es so, wesentlich höhere ETP Werte zu erreichen, indem AT bis zu 30 Minuten wirkungsvoll durch HD1-22 blockiert wird.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Aptamere die amidolytische Aktivität des Thrombins beeinflussen können. Dieser Aktivitätsverlust ist allem Anschein nach auf eine Konformationsänderung innerhalb des Thrombinmoleküls zurückzuführen. Des Weiteren konnte im Puffersystem gezeigt werden, dass die Aptamere, obwohl sie an unterschiedlichen Exosites der Thrombinoberfläche binden, die Konformation des Thrombins so beeinflussen können, dass AT und Heparin in ihrer gemeinsamen Rolle als irreversibler Inhibitor des Thrombins behindert werden. Entscheidend für die AT Blockierung durch die Aptamere ist dabei die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), denn auf Grund der irreversiblen Inhibition Thrombins durch Antithrombins ist entscheidend, wie hoch die Affinität zwischen Aptameren und Thrombin ist, denn alles freie Thrombin wird sofort durch AT irreversibel inhibiert (*Pike et al., 2005*). Die  $K_D$  zwischen Thrombin und HD1-22 beträgt 0,65 nM, für HD1 7,1 nM und für HD22 2,4 nM (*Müller et al., 2008*). Umso höher die Gleichgewichtskonstante ist, desto mehr Thrombin liegt in undissozierter Form vor und kann von AT inhibiert werden.

#### 4.5 Aptamerverhalten im Plasma

Die bisherigen Experimente wurden in gereinigtem System (TBS-Puffer) an bereits aktivem Thrombin durchgeführt. Es konnte die direkte Beeinflussung der Aptamere auf die amidolytische Aktivität, die Beeinflussung der AT- und Heparinbindung an Thrombin und die Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe charakterisiert werden. Im Folgenden wurde das Testsystem erweitert, indem die Aptamere in Plasma getestet wurden. Der TGA eignet sich hierfür gut, um die unterschiedlichen Aspekte der Thrombingenerierung, der amidolytischen Thrombinaktivität und der Thrombininhibition zu beschreiben. Die Experimente im TGA beschreiben also nicht nur die



amidolytische Thrombinaktivität, sondern geben Auskunft über die drei Teilschritte, der Thrombinaktivierung, den zeitlichen Verlauf des Aktivitätsgrades und schließlich der Inaktivierung des Thrombins. Diese drei 3 Teilschritte werden in dem nächsten Kapitel gesondert diskutiert.

#### 4.5.1 Einfluss der Aptamere auf die Thrombinaktivierung im Plasma

Die Thrombingenerierung wird im TGA durch die Parameter lagtime und tpeak charakterisiert. Die lagtime beschreibt die Zeit, die, von dem Start der Reaktion bis zu dem ersten Signal (Substratumsatz durch entstandenes Thrombin) vergeht und die tpeak beschreibt die Zeit von Start bis zum Erreichen des maximalen Substratumsatzes (peak). Auswirkung auf diese Zeit haben folgende Faktoren: Die beiden Aptamere HD1 und HD1-22 können an die Pro-Exosite 1 des Prothrombins binden und es in seiner Aktivierung hemmen (*Kretz et al., 2006*). Der positive Feedback-Mechanismus über die Faktoren V und VIII, die an Exosite 1 und 2 binden, kann durch die Aptamere ebenfalls unterbunden werden und so ebenfalls eine Verzögerung der lagtime und tpeak bewirken (*Adams et al., 2006*). Schließlich können die Aptamere selber Thrombin in der amidolytischen Aktivität blockieren (*Müller et al., 2008*). In den TAT Elisa Versuchen (Kapitel 3.2.4.2) ist in den ersten 4 Minuten kein Signal der TAT Komplexe nachzuweisen, demzufolge hat AT keinen Einfluss auf die lagtime (evtl. ist der Versuch aber auch nicht sensibel genug, um die geringen TAT-Komplexe nachzuweisen). Die Hemmung der proteolytischen Aktivität Thrombins durch D-Dimere (*Nesheim et al., 2001*) hat in diesem Experiment auch keine Auswirkung, da defibrinisiertes Plasma verwendet wurde und es dementsprechend nicht zu einer Bildung von D-Dimeren kommen konnte. Die Verlängerung der lagtime, die nur gering bei HD1 und HD22 ausgeprägt ist, dafür aber stark bei HD1-22 (mit einer Verlängerung von etwa 4 Minuten), kann also auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein:

Die direkte Blockierung von Prothrombin durch HD1 und HD1-22 ist bereits beschrieben worden (*Kretz et al., 2006; Müller et al., 2008*), dieser Effekt kann aber nicht alleine für die verlängerte lagtime verantwortlich sein, da HD22, welches nicht an Prothrombin binden kann, eine stärkere Verlängerung bewirkt als HD1. Die Verhinderung des positiven Feedback-Mechanismus über die Faktoren V und VIII, wie bei *Müller et al.* beschrieben, ist sehr wahrscheinlich, auch wenn sie mit dem Versuchsaufbau nicht direkt bewiesen werden kann. Die Inhibition der Thrombinaktivität durch die Aptamere selber ist ein weiterer Aspekt, der mit Sicherheit eine Rolle spielt, wenn man die Inhibition der amidolytische Thrombinaktivität um über 50 % durch HD1-22 bedenkt,

wie unter Kapitel 3.1 aufgezeigt werden konnte (siehe auch Abb. 6).

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Verlängerung der lagtime und der tpeak, die für HD1-22 sehr stark ausgeprägt ist, durch die Kombination der Blockierung der Prothrombinaktivierung zu Thrombin, der direkten Aktivitätsinhibition des Thrombins und der Unterbindung des positiven Feedbackmechanismus über die Faktoren V und VIII zustande kommt. Welcher dieser drei Faktoren hier die größte Bedeutung hat, ist mit den durchgeführten Versuchen nicht nachzuweisen.

Die lagtime steigt bei allen Aptameren konzentrationsabhängig an, die tpeak bleibt allerdings bei HD1 und HD22 gleich und steigt nur bei HD1-22 auf das Doppelte. Das absolute Fehlen jeglicher Verlängerung der tpeak Zeit durch HD22 bedeutet, dass der direkte inhibitorische Effekt der Aptamere nicht für die langsamere Thrombinaktivierung verantwortlich ist, denn HD22 kann die amidolytische Thrombinaktivität um über 50 % blockieren (siehe Abb.6) und trotzdem steigt die Aktivität bis zum peak gleich schnell an wie im Leerwert. HD1-22 mit einer Blockade von 60 % verdoppelt die tpeak jedoch. Eine mögliche Erklärung ist die Blockierung beider Exosites durch HD1-22, die beide für die Aktivierung der Faktoren V und VIII benötigt werden. Die Blockierung von nur einer Exosite, wie es durch HD1 oder HD22 geschieht, reicht anscheinend nicht aus, um den positiven Feedbackmechanismus entscheidend zu verzögern.

#### 4.5.2 Einfluss der Aptamere auf die Thrombinaktivität im Plasma

Der peak Wert, als Charakteristikum für die maximale Thrombinaktivität, ist in der Anwesenheit von HD22 und HD1-22 etwa gleich erhöht (siehe Abb. 20), auch wenn der peak durch HD1-22 5 Minuten später erreicht wird. Die Thrombinaktivität müsste eigentlich durch die Aptamere inhibiert werden. Betrachtet man die tpeak Zeiten der Aptamere im TAT-Elisa (siehe Abb. 23), dann wird deutlich, dass HD22 keine Verminderung der TAT-Komplexe im Vergleich zum Leerwert bei 5 Minuten erreicht und trotzdem den peak-Wert erhöht. HD1-22 verdoppelt wie HD22 den peak und kann, wie die TAT-Komplexe zeigen, die AT Bindung an Thrombin beeinflussen. Die Aktivitätssteigerung des Thrombins in Anwesenheit von HD22 ohne eine Beeinflussung der AT-Bindung an Thrombin lässt auf andere inhibitorische Faktoren schließen, die auf die Thrombinaktivität wirken, aber durch die Aptamere inhibiert werden. Um hier abschließende Aussagen machen zu können, wären weitere Untersuchungen durchzuführen. So könnte der Heparinkofaktor II, der in vivo für etwa 20-30 % der Thrombin Inhibition verantwortlich ist, eine

wichtige Rolle spielen. Dieses Serpin, in seinem Aufbau dem AT ähnlich, bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an die Exosite 1 des Thrombinmoleküls (*Pöttsch und Madlener, 2002*).

#### 4.5.3 Einfluss der Aptamere auf die Thrombininhibition im Plasma

Das deutlich erhöhte ETP unter HD1-22 Einfluss (siehe Abb. 21) ist mit einer höheren Thrombinaktivität zu erklären, die über einen längeren Zeitraum wirken kann (siehe Abb.22). Dies ist ein Ausdruck der Blockierung der AT Bindung an Thrombin.

HD22 hat in etwa die gleiche maximale Aktivität (peak) wie unter HD1-22 Einfluss, es dissoziiert aber (auf Grund der hohen off-rate) schneller aus dem Aptamer-Thrombin-Komplex, so dass AT das Thrombin irreversibel hemmen kann. Im Puffersystem kann HD1-22 auch bei sehr hohen AT-Konzentrationen Thrombin 20 Minuten vor einer Inhibition schützen (siehe Abb. 14). Im Plasma ist dieser Schutz vor AT bis zu 30 Minuten erkennbar. Der Beweis, dass HD1-22 das ETP vergrößert, indem es Thrombin vor der AT-Inhibition schützt, wird in Kapitel 3.2.4.2 erbracht. Die TAT-Komplex-Entstehung kann durch HD1-22 in einem Zeitraum zwischen 5 und 25 Minuten deutlich verhindert werden. Der Effekt ist für HD22 und HD1 nicht eindeutig zu erkennen und beide Aptamere haben auch keinen Einfluss auf die start tail Zeit.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Aptamere HD1 und HD22 -und in der Wirkungsstärke noch überlegen- das Fusionaptamer HD1-22, die Thrombineigenschaften im Plasma modifizieren. Dabei wird dessen Aktivierung verzögert, die maximale amidolytische Aktivität gesteigert und die irreversible Inhibition durch AT für einen gewissen Zeitraum verhindert, (*Müller et al., 2008*). In diesen Effekten ist das Fusionsaptamer den beiden Aptameren HD1 und HD22 überlegen. Die Aktivität von Thrombin wird insgesamt nicht verringert. Die Aptamere inhibieren die amidolytische Aktivität im gereinigtem System, aber in Anwesenheit von anderen Gerinnungsfaktoren im Plasma verlängern sie auch den Zeitraum, in dem das Thrombin aktiv ist, indem sie das Thrombin vor der AT-Inhibition schützen; dies resultiert in einem vergrößerten ETP.

#### 4.6 Die Aptamerwirkung auf die Thrombomodulin-Thrombin Interaktion

Die bisherigen Experimente haben den Einfluss der Aptamere auf die direkte amidolytische Thrombinaktivität und auf die AT Blockierung nachgewiesen. Im Plasma und in vivo auch zell-

gebunden befindet sich noch ein weiterer Großteil aller Gerinnungsfaktoren und pro- und anti-koagulatorisch wirksame Faktoren. Es liegt also nahe, dass noch weitere Faktoren der Gerinnungskaskade in ihrer Bindung an Thrombin durch die Aptamere beeinflusst werden. Aus diesem Grund sollte mit der nächsten Versuchsserie die Beeinflussung der Aptamere auf die Thrombinbindung an Thrombomodulin untersucht werden. Ausgewählt wurde für diese Arbeit das Thrombomodulin, weil in den letzten Jahren vermehrt die Bedeutung des Protein C Systems in inflammatorischen Prozessen bekannt geworden ist (*Bernard et al., 2001*) und die Behandlung mit aktivierten Protein C im Falle einer Sepsis und zerebralen Ischämie eine neue Interventionsmöglichkeit darstellt (*Guo et al., 2004*). Somit ist die Funktion der Aptamere auf dieses System sicherlich von besonderer Bedeutung.

#### 4.6.1 Einfluss der Aptamere auf die Thrombomodulin-Thrombin-Bindung

Das Experiment unter Kapitel 3.3.1 stellt den Effekt aller Aptamere auf den APC Substratumsatz dar, der Ausdruck der Protein C-Aktivierung ist und somit Rückschlüsse auf die Thrombin-Thrombomodulinbindung möglich macht. Hierbei zeigt HD1-22 mit einem  $IC_{50}$  Wert von 4,17 nM seine Überlegenheit gegenüber den anderen Aptameren in der Beeinflussung der Thrombinbindung an Thrombomodulin, was in Abb. 24 durch den APC-Substratumsatz dargestellt ist. Die Tatsache, dass HD22 besser die Thrombinbindung an Thrombomodulin blockiert ( $IC_{50} = 40$  nM), als HD1 ( $IC_{50} = 382$  nM), welches mit der Exosite 1 die gleiche Bindungsstelle hat wie Thrombomodulin, ist auf den ersten Blick erstaunlich, aber durch den Effekt der allosterischen Umlagerung zu erklären, wie auch von Petrera im Zusammenhang mit Fibrinogen bewiesen wurde (*Petrera et al., 2009*). Die Aptamere können also die Thrombinbindung an Thrombomodulin unterschiedlich stark beeinflussen. Wie aus den vorhergehenden Experimenten zu erwarten war, hat HD1-22 hier die beste Wirkung gezeigt. HD22 konnte die Thrombin-Thrombomodulin-Bindung jedoch stärker blockieren als HD1, obwohl HD1 die gleiche Bindungsstelle wie Thrombomodulin hat. Dies ist mit der höheren Affinität an Thrombin (*Müller et al., 2008*) und der allosterischen Umlagerung innerhalb des Thrombinmoleküls zu erklären (*Petrera et al., 2009*).

#### 4.6.2 Zeitabhängige Aptamerwirkung

Der zeitliche Verlauf, der im Experiment unter Kapitel 3.3.2. untersucht wurde, zeigt eine Abnahme der Aptamerwirkung mit zunehmender Inkubationszeit. Nach 30 Minuten können die Aptamere aber noch immer die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin beeinflussen, im

Gegensatz zu der AT Wirkung, die nach 20 Minuten schon keinen Effekt der Aptamere mehr erkennen lässt. Dieser Effekt ist mit der irreversiblen Inhibition von Thrombin durch AT zu erklären. Im Falle des Thrombomodulins dissoziieren die Aptamere von Thrombin ab und ermöglichen eine Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, wodurch Protein C aktiviert werden kann. Auf Grund der reversiblen Bindung von Thrombin an Thrombomodulin löst sich dieser Komplex (*Rezaie et al., 1998*) und macht erneut Platz für die kompetitive Hemmung durch die Aptamere. Die Stärke der Bindungsaffinität zwischen den Aptameren und Thrombin spiegelt sich auch in diesen Ergebnissen wieder. HD1-22 mit einer  $K_D$  von 0,65 nM zeigt als einziges Aptamer keinen Wirkungsverlust im Laufe von 30 Minuten.

Zusammenfassend ist zu sagen, das die Aptamere die Thrombinanlagerung an Thrombomodulin wirkungsvoll beeinflussen, wobei diese Blockade bei HD1 durch eine direkte Besetzung der Bindungsstelle entsteht und HD22 eine allosterische Veränderung innerhalb des Thrombinmolekül bewirkt, welches die Fähigkeit der Thrombomodulinbindung behindert. Auch in diesem Testansatz ist die überlegene Wirkung des Fusionsaptameres zu erkennen, die sich aus den besseren Bindungseigenschaften und der simultanen Blockade beider Exosites erklären lässt.

#### 4.6.3 Thrombomodulin Wirkung im Plasma

Um den Effekt der Thrombomodulinwirkung und deren Beeinflussung durch die Aptamere im Plasma darzustellen, wurden TGA Versuche durchgeführt. Zunächst wurde die alleinige Wirkung von Thrombomodulin auf die TGA-Parameter (lagtime, tpeak, peak, ETP und start tail) untersucht. Dies geschah mit einer Thrombomodulin Verdünnungsreihe (siehe Kapitel 3.3.3). Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass Thrombomodulin nicht alle Parameter beeinflusst. Die tpeak und die start tail Zeit werden nicht eindeutig verändert. Die lagtime verlängert sich nur moderat. Das ETP und der Peak nehmen jedoch stark ab.

Die Erklärung dieser Phänomene ergibt sich aus folgender Konstellation: Kommt es zu einer Bindung von Thrombomodulin an die Thrombin Exosite 1, dann verändert sich die Substratspezifität des Thrombins, es wird also weniger Fibrinogen gespalten, dafür aber ein negativer Feedback-Mechanismus über Protein C aktiviert, welcher die Thrombinaktivierung hemmt (*Sadler, 1997*). Die Bindung von Thrombomodulin an Thrombin bewirkt also eine Aktivierung von Protein C, welches den aktivierten Faktor Va und (in Zusammenarbeit mit Protein S und Faktor Vac) Faktor VIIIa inaktiviert (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005*). Faktor Va und VIIIa sind Kofaktoren,

welche durch Thrombin selbständig aktiviert werden und die Thrombinaktivierung stark beschleunigen (*Rawala-Sheikh et al., 1990*). Dieser positive Feedbackmechanismus wird in der Anwesenheit von Thrombomodulin und dem Protein C-System abgeschwächt.

Des Weiteren verstärkt Thrombomodulin, im Komplex mit Thrombin, die AT-Inhibition von Thrombin um das 20-fache (*Pötzsch und Madlener, 2002*). Die durch die Thrombomodulin verstärkte TAFI-Aktivierung (*Dempfle, 2007*), welche sich in einer Hemmung der Fibrinolyse deutlich macht, spielt in diesem Versuch keine Rolle, da defibrinisiertes Plasma verwendet wurde. Die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin nimmt keinen Einfluss auf die amidolytische Thrombinaktivität.

#### 4.6.4 Die kombinierte Wirkung der Aptamere und Thrombomodulin auf Thrombin

In dem gereinigten System konnte mit den Experimenten unter Kapitel 3.3.1 die inhibitorische Wirkung der Aptamere auf die Thrombin-Thrombomodulin-Bindung anhand des APC Substratumsatzes dargestellt werden. Dies sollte nun auch im Plasma und in den TGA-Versuchen dargestellt werden, indem die Wirkung des Thrombomodulins (verringerte ETP und peak) durch die Aptamere aufgehoben wird. Dieser Effekt konnte aber in den Experimenten unter Kapitel 3.3.3 nicht dargestellt werden, und die Wirkung der Aptamere, besonders HD22 und HD1-22, verstärkten die inhibitorische Wirkung des Thrombomodulins sogar.

Diese synergistische Wirkung durch die Aptamere und Thrombomodulin auf die Inhibition des Thrombins könnte möglicherweise auf folgende Phänomene zurückgeführt werden:

Die Exosite 1 und 2 des Thrombins sind bei der Aktivierung von Faktor V und VIII beteiligt (*Adams, 2006*). Diese verstärken dann, wie in der Einleitung beschrieben wurde, über die Anlagerung an den Faktor-X-Aktivator-Komplex (Faktor VIIIa) und an die Prothrombinase (Faktor Va) die Thrombinaktivierung über einen positiven Feedback-Mechanismus (*Johne et al., 2006; Tans et al., 1997*). Diese Thrombin-eigene Aktivierung der Faktoren V und VIII wird vermutlich, basierend auf den Ergebnissen für die AT-, Heparin- und Thrombomodulinblockierung, auch hier durch die Aptamere blockiert.

Zusätzlich werden die aktivierten Faktor V- und VIII- Moleküle durch das Protein C System inaktiviert (*Dahlbäck und Villoutreix, 2005*). Das einmal gebildete Thrombin hat also keine Möglichkeit, den eigenen positiven Feedbackmechanismus zu aktivieren, da Faktor V und VIII wahrscheinlich durch die Aptamere, die die Bindungsstellen am Thrombin blockieren, in Ihrer

Aktivierung gehemmt werden. Zusätzlich werden die aktivierten Faktoren V und VIII durch die hohe Thrombomodulinkonzentration und damit starken Protein C Aktivität inaktiviert. Es ergibt sich also eine verringerte Aktivität des Thrombins (erniedrigte ETP und peak) in Anwesenheit von HD22, HD1-22 und Thrombomodulin.

Eine mögliche Erklärung für die Beschleunigung der lagtime in Anwesenheit von HD1-22 und Thrombomodulin ist, dass die Aptamere als GAG-ähnliche Bindungsverstärker zwischen dem Thrombin-Thrombomodulin-Komplex und dem PCI wirken. So konnte in den Experimenten von Müller et al. gezeigt werden, dass ein einzelsträngiges DNA-Aptamer (HS02), welches selektiv mit einer hohen Affinität an APC bindet, in der Lage ist, die Bindung des APC mit dem Protein-C-Inhibitor zu verstärken, ähnlich wie es Gykosaminoglykane tun (*Müller et al., 2009*). Dieses Phänomen wurde auf den anionischen Charakter des Aptamers und den damit einhergehenden elektrostatischen Wechselwirkungen zurückgeführt, die eine Verstärkung der Proteininteraktion durch das Aptamer bewirken.

Die Tatsache, dass Aptamere die Heparin-Brückenbildung mittels ihres anionischen Charakters beschleunigen können (*Müller et al., 2009*) und PCI, im Vergleich zu AT, durch eine Reihe von großen negativ-geladenen Molekülen (geringe Spezifität) in seiner Wirkung verstärkt werden kann (*Pratt und Church, 1992*), legt die Vermutung nahe, dass das Aptamer HD1-22 mit der Bindung an Exosite 2 eine anionische Brücke zwischen dem Thrombin-Thrombomodulin Komplex und dem PCI herstellt, um so eine stärkere Bindung zu erzeugen, die sich dann in einer Hemmung der negativen Feedbackschleife über Protein C und schließlich in einer Verkürzung der lagtime niederschlägt, da die Thrombinaktivierung über Faktor V und VIII wieder verstärkt werden kann. Diese heparinartige Wirkung der Aptamere auf die PCI Bindung an den Thrombin-Thrombomodulinkomplex scheint, den hier ermittelten Ergebnissen zu Folge, für die AT Bindung an Thrombin nicht zu gelten. Dies deckt sich mit Aussagen von Pratt und Church, die für AT eine höhere Spezifität der GAG-Erkennung entdeckten (*Pratt und Church, 1992*).

Dies sind jedoch nur Vermutungen, die mit weiteren Untersuchungen in diesem Bereich abgeklärt werden müssten.

#### 4.7 Die Aptamerwirkungen im Vergleich

Der Vergleich der einzelnen Aptamere und deren Wirkung auf Thrombin lassen folgende

Schlussfolgerungen zu:

Die Bindung von HD22 an die Exosite 2 beeinflusst das Aktive Zentrum und die gegenübergelegene Exosite 1 stärker durch eine allosterische Umlagerung als es für HD1 an der Exosite 1 der Fall ist. Zu sehen ist das an der stärkeren Inhibition (im Vergleich zu HD1) der amidolytischen Thrombinaktivität durch HD22 (siehe Abb. 6), der stärkeren Blockierung der Inhibition von Thrombin durch AT (siehe Abb. 8) und der stärkeren Blockade der Bindung von Thrombin an TM (siehe Abb. 24). Daraus läßt sich jedoch nicht herleiten, ob das Aptamer HD22 stärkere Konformationsänderungen im Thrombin induziert oder die Exosite 2 eine generell stärkere Beeinflussung auf die Konformation des Thrombinmoleküls hat. Ein Argument für die generell starke Bedeutung der Exosite 2 für die Konformation findet sich in der Literatur beschrieben. Hier wird die Fähigkeit von Heparin und F2 (ein RNA Aptamer an die Exosite 2 bindend), die Exosite 1 beeinflussen zu können, beschrieben (*Carter et al., 2005; Long et al., 2008*). HD1 zeigt diese Konformationsänderung in abgeschwächter Form auf das Aktive Zentrum (siehe Abb. 6) und auf die Heparinbindung an Exosite 2 (vergleiche Abb. 12).

Das Fusionsaptamer war in allen Messungen den einzelnen Aptameren in der Wirkung auf das Thrombin überlegen. Dies basiert auf besseren Bindungseigenschaften  $K_D$  0,65 nM im Vergleich zu 7,1 nM für HD1 (*Müller et al., 2007*) und der simultanen Exosite-Blockierung, welche zu einer effektiveren Blockade der Bindungspartner des Thrombins und zu der Konformationsänderung innerhalb des Moleküls führen.



## 5 Zusammenfassung

Thrombin ist ein multifunktionelles Enzym, dem eine zentrale Rolle in der Aktivierung und Regulation der Gerinnungsantwort zukommt. Dazu interagiert es mit verschiedenen makromolekularen Substraten. Auf molekularer Ebene werden diese Interaktionen durch Molekülregionen, sogenannte Exosites, gesteuert, die in Nachbarschaft zu dem aktiven Zentrum liegen. Die Entwicklung der Aptamere HD1, HD22 und des Fusionsaptamers HD1-22 macht es möglich, gezielt die Exosite 1 (HD1) oder 2 (HD22) oder beide Exosites (HD1-22) zu blockieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Aptamerwirkung auf die Bindungseigenschaften von Antithrombin, Heparin und Thrombomodulin an Thrombin zu untersuchen und die zeitliche Stabilität der Aptamer-Thrombinkomplexe darzustellen. Außerdem sollte die Exositeselektivität der einzelnen Aptamere genutzt werden, um mögliche intramolekulare Exosite-Wechselwirkungen und deren Auswirkungen auf die Thrombinaktivität zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Aptamere die Bindung von Antithrombin, Heparin und Thrombomodulin an Thrombin unterschiedlich stark verhindern können. Diese Eigenschaften der Aptamere werden durch die direkte Blockade der Exosites erzeugt. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass -anders als erwartet- die Bindung der Aptamere HD 1 und HD 22 nicht nur die Bindungspartner der korrespondierenden Exosite beeinträchtigen, sondern auch die nicht unmittelbar in die Bindung involvierte Exosite und das Aktive Zentrum beeinflussen. Diese Ergebnisse konnten die Theorie der intramolekularen Konformationsänderung, die durch die Exositebindung induziert wird und zwischen den beiden Exosites und dem Aktiven Zentrum besteht, bestärken. Das Fusionsaptamer (HD1-22) übertrifft durch die kombinierte Bindung der Exosite 1 und 2 und den stärkeren Bindungseigenschaften an Thrombin alle Effekte von HD1 und HD22 deutlich.

Eine Betrachtung der Aptamereffekte auf die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin konnte zeigen, dass die Aptamerwirkung im gereinigten System und im Plasma unterschiedlich ist. Während im gereinigten System die Aptamere die Anlagerung von Thrombin an Thrombomodulin teilweise inhibieren, kommt es im Plasma zu einer Verstärkung der Thrombin-Inhibition, da es entweder zu einer effektiveren Blockierung der positiven Feedbackschleife (über Faktor V und VIII) kommt oder die Aptamere mit ihrem anionischem Charakter eine heparinartige Funktion ausüben und die Bindungsfähigkeit von PCI an dem Thrombin-Thrombomodulinkomplex beschleunigen.

Des Weiteren konnte die Stabilität der Aptamer-Thrombin-Komplexe in defibrinisiertem Plasma dargestellt werden und eine Korrelation mit den Messungen der Dissoziationskonstante der Aptamere im SPR Verfahren aufgezeigt werden (*Müller et al., 2008*). Es ergab sich eine Halbwertszeit der Aptamer-Thrombin-Komplexe für HD1 von 1,5 Minuten, für HD22 von 3,25 Minuten und für HD1-22 von 4,5 Minuten.

Die erhobenen Befunde verdeutlichen, dass mit den Exosite-spezifischen Aptameren selektiv verschiedene Thrombinfunktionen blockiert werden können. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die daraus gewonnenen Erkenntnisse die Entwicklung neuer Antikoagulationsstrategien beeinflussen können.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung der sekundären Hämostase; Aus: Wikipedia, 2007: Coagulation. [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Coagulation\\_full.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Coagulation_full.svg) (Zugriffsdatum: 07.12.2010)

Abbildung 2: Molekularstruktur des Thrombins; Aus: Müller J, Wulffen B, Pöttsch B, Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chembiochem.* 2007; 8: 2223-2226

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Selex Verfahrens; Modifiziert nach: Wikipedia, 03.04.2008: Selex. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Selex.png> (Zugriffsdatum: 07.12.2010)

Abbildung 4: Aptamerstruktur; Aus: Müller J, Wulffen B, Pöttsch B, Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chembiochem.* 2007; 8: 2223-2226

Abbildung 5: Der Graph einer TGA Messung (entnommen aus dem TGA Programm)

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams E, Huntington JA. Thrombin-cofactor interactions- structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1738-1745
- Adams GP, Schier, R. Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J. Immunol. Methods* 1999; 231: 249-260
- Alvarez-Salas LM. Nucleid acids as therapeutic agents. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8: 1379-1404
- Anderson PJ, Nettet A, Bock PE. Effects of activation peptide bond cleavage and fragment 2 interactions on the pathway of exosite I expression during activation of human prethrombin1 to thrombin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278; 44482-44488
- Andrews RK, Berndt MC. Adhesion-dependent signalling and the initiation of haemostasis and thrombosis. *Histol Histopathol.* 1998; 13: 837-844
- Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; 176 (Pt 2): 1-41
- Babuín L, Pengo V. Argatroban in the management of heparin-induced thrombocytopenia. *Vasc Health Risk Manag.* 2010; 6: 813-819
- Baglia FA, Badellino KO, Li CQ, Lopez JA, Walsh PN. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem.* 2002; 277: 1662-1668
- Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2511-2518
- Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm.* 2008; 78: 157-184
- Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 565-576
- Bartel DP, Szostak JW. Isolation of new ribozymes for a large pool of random sequences. *Science.* 1993; 261: 1411-1418
- Barthels M, Kempkes-Matthes B, Pötzsch B, Preissner KT, Riess H. Hemostasis and thrombosis research - an intensive course in clinical hemostasis. *Hamostaseologie.* 2008; 28: 255-256
- Baruch D. Platelet vessel wall interactions. *Therapie.* 2006; 61: 371-378
- Beaudry A, DeFoe J, Zinnen S, Burgin A, Beigelman L. In vitro selection of a novel nuclease-resistant RNA phosphodiesterase. *Chem Biol.* 2000; 7: 323-334
- Beaudry AA., Joyce GF. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science.* 1992; 257: 635-641

- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 2001; 344: 699-709
- Bock LC., Griffin LC., Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nat*. 1992; 355: 564-566
- Bode W. The structure of thrombin, a chameleon-like proteinase. *J Thromb Haemost*. 2005; 3; 2379-2388
- Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9 Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone inhibited human  $\alpha$ -thrombin. Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active site geometry, structure-function relationships. *Protein Sci*. 1992; 1: 426-471
- Breitenstein A, Camici GG, Tanner FC. Tissue factor: beyond coagulation in the cardiovascular system. *Clin Sci*. 2009; 118: 159-172
- Carter WJ, Cama E, Huntington JA. Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J Biol Chem*. 2005; 280: 2745-2749
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. May 2005; 129: 307-321
- Chen VM, Hogg PJ. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 2533-2541
- Colman RW, Schmaier AH. The contact activation system: biochemistry and interactions of these surface-mediated defense reactions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1986; 5: 57-85
- Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticouglant Pathway: Novel Insight Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005; 25: 1311-1320
- Dempfle CE. The TAFI system. The new role of fibrinolysis. *Hamostaseologie*. 2007; 27: 278-281
- Di Cera E, Guinto ER, Vindigni A, Dang QD, Ayala YM, Wuyi M, Tulinsky A. The Na<sup>+</sup> binding site of thrombin. *J Biol Chem*. 1995; 270: 22089-22092
- Di Cera E. Thrombin. *Mol. Aspects Med*. 2008; 29: 203-254
- Duffy EJ, Angliker H, Le Bonniec BF, Stone SR. Allosteric modulation of the activity of thrombin. *Biochem J*. 1997; 321: 361-365
- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nat*. 1990; 346: 818-822

- Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2003; 1: 1343-1348
- Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*, 2004;47: 305-314
- Gandhi PS, Chen Z, Mathews FS, and Di Cera E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 1832-1837
- Gao L, Chao L, Chao J. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res*. 2010; 316: 376-389
- Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004; 61: 498-511
- Gerlach E, Becker BF. Interaction of blood and the vascular wall: hemostatic aspects. *Z Kardiol*. 1993; 82: 13-21
- Girolami A, Scandellari R, Scapin M, Vettore S. Congenital bleeding disorders of the vitamin K-dependent clotting factors. *Vitam Horm*. 2008; 78: 281-374
- Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64: 763-797
- Golino P, Forte L, De Rosa S. Inhibition of the tissue factor coagulation pathway. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004; 2: 319-327
- Greinacher A, Warkentin TE. The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thromb Haemost*. 2008; 99: 819-829
- Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood*, 1993; 81: 3271-3276
- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T. Activated protein C prevent neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*, 2004; 42: 563-572
- Hasegawa H, Taira KI, Sode K, Ikebukuro K. Improvement of aptamer affinity by dimerization. *Sensors* 2008; 8; 1090-1098
- Hoylaerts MF. Platelet-vessel wall interactions in thrombosis and restenosis role of von Willebrand factor. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 1997; 59: 161-183
- Huang M, Rigby AC, Morelli X, Grant MA, Huang G, Furie B, Seaton B, Furie BC. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Biol*. 2003; 10: 751-756
- Huntington JA. Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1535-1549

- Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009; 1: 17-20
- Johne J, Blume C, Benz PM, Pozgajová M, Ullrich M, Schuh K, Nieswandt B, Walter U, Renné T. Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biol Chem.* 2006; 387: 173-178
- Joyce GF. In vitro evolution of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol.* 1994; 4: 331-336
- Kehrel BE. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hamostaseologie* 2003; 23: 149-158
- Kehrel BE. Platelets: biochemistry and physiology. *Hamostaseologie.* 2008; 28: 289-298
- Kim Y, Cao Z, Tan W. Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 5664-5669
- Kretz CA, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. HD1, a thrombindirected aptamer, binds exosite 1 on prothrombin with high affinity and inhibits its activation by prothrombinase. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 37477-37485
- Liu LW, Vu TK, Esmon CT, Coughlin SR. The region of the thrombin receptor resembling hirudin binds to thrombin and alters enzyme specificity. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 16977-16980
- Leow D. Thrombembolie. In: Rietbrock N, Staib AH, Loew D, Hrsg. *Klinische Pharmakologie: Arzneitherapie.* Darmstadt: Steinkopff, 1990: 235-237
- Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 442-449
- Long SB, Long MB, White RR, Sullenger BA. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA.* 2008; 14: 2504-2512
- Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006; 208: 327-339
- McVey JH. Tissue factor pathway. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999; 12: 361-372
- Macaya RF, Schulze P, Smith FW, Roe Ja, Feigon J. Thrombinbinding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3745-3749
- Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1687-1693
- Markwardt F. Hirudin as alternative anticoagulant-a historical review. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28: 405-414
- Mayer G, Famulok M. Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche. *Pharm. Unserer Zeit.* 2007; 36: 432-436

- Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 66-74
- Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894-1904
- 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; 6: 2105-2112
- Müller J, Isermann B, Dücker C, 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. *Chem Biol.* 2009; 14: 442-451
- Müller J, Wulffen B, Pötzsch B, Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *Chembiochem.* 2007; 8: 2223-2226
- Mureebe L. Direct thrombin inhibitors: alternatives to heparin. *Vascular.* 2007; 15: 372-375
- Neri D, Momo M, Prespero T, Winter G. High-affinity antigen binding by chelating recombination antibodies (CRAbs.). *J. Mol. Biol.* 1995, 246, 367-373
- Ng EW, Shima T, Calias P, Cunningham ET Jr, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 123-132
- Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Bailliers Clin Haematol.* 1993; 6: 653-690
- Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17: 369-383
- Nutescu EA, Shapiro NL, Chevalier A. New anticoagulant agents: direct thrombin inhibitors. *Cardiol Clin.* 2008; 26: 169-187
- Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M. The vitamin K cycle. *Vitam Horm.* 2008; 78: 5-62
- Perzborn E, Kubitzka D, Misselwitz F. Rivaroxaban. A novel, oral, direct factor Xa inhibitor in clinical development for the prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Hamostaseologie.* 2007; 27(4): 282-289
- Petrera NS, Stafford AR, Leslie BA, Kretz CA, Fredenburgh JC, Weitz JL. Long range communication between exosite 1 and 2 modulates thrombin function. *J Biol Chem.* 2009; 284: 25620-25629
- Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins – getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J.* 2005; 272: 4842-4851



- Pineda AO, Carrell CJ, Bush LA, Prasad S, Caccia S, Chen ZW, Mathews FS, Di Cera E. Molecular dissection of Na<sup>+</sup> binding to thrombin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 31842-31853
- Pineda AO, Chen ZW, Marino F, Mathews FS, Mosesson MW, Di Cera E. Crystal structure of thrombin in complex with fibrinogen gamma' peptide. *Biophys. Chem.* 2007; 125: 556-559
- Pospisil CH, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. Evidence that both exosites on thrombin participate in its high affinity interaction with fibrin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 21584-21591
- Pötzsch B, Madlener K. Primäre hämorrhagische Diathesen. Last but not least: Physiologie In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Gerinnungskonsil.* Stuttgart- New York: Thieme, 2002; 18-49: 212-224
- Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 2010
- Pratt CW, Church FC. Heparin binding to protein C inhibitor. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 8789-8794
- Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers-basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 69: 367-374
- Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 102-115
- Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN. Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry.* 1990; 265: 20907-20911
- Rezaie AR, He X, Esmon CT. Thrombomodulin increases the rate of thrombin inhibition by BPTI. *Biochemistry.* 1998; 13: 693-699
- Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 4-13
- Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13: 657-670
- Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 16256
- 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

- Sabo TM, Farrell DH, Maurer MC. Conformational analysis of gamma' peptide (410427) interactions with thrombin anion binding exosite II. *Biochemistry*. 2006; 45: 7434-7445
- Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 392-395
- Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationship in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13: 39-45
- Schwienenhorst A. Direct thrombin inhibitors – a survey of recent developments. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2773-2791
- Silbernagel S, Despopoulos A. Hämostase. In: Silbernagel S, Despopoulos A, Hrsg. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007: 102-104
- Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity*. *J. Biol. Chem*. 1989; 264: 17049-17057
- Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr Med Chem*. 2004; 11: 2245-2260
- Steen M. Factor Va-factor Xa interactions: molecular sites involved in enzyme: cofactor assembly. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2002; 237: 5-11
- Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med*. 2011; 89: 109-121
- Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47: 565-594
- Stouffer GA, Runge MS. The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Semin. Thromb. Hemost*. 1998; 24: 145–150
- Stubbs MT, Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb Res*. 1993; 69: 1-58
- Takemura K, Wang P, Vorberg I, Surewicz W, Priola SA, Kanthasamy A, Potththil R, Chen SG, Sreevatsan S. DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity. *Exp Biol Med*. 2006; 231: 204-214
- Tans G, Nicolaes GA, Rosing J. Regulation of thrombin formation by activated protein C: effect of the factor V Leiden mutation. *Semin Hematol*. 1997; 34: 244-255
- Tasset DM, Kubik MF, Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol*. 1997; 272: 688-698
- Thomas S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab*. 2002; 48: 247-262

- Tuerk C, Gold L. Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990; 249: 505-510
- Verhamme IM, Olson ST, Tollefsen DM, Bock PE. Binding of exosite ligands to human thrombin. Re-evaluation of allosteric linkage between thrombin exosites I and II. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 6788-6798
- Viti F, Tarli L, Giovanni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombination antibody fragment lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res.* 1999; 59: 347-352
- Wada H, Sakuragawa N. Are fibrin-related markers useful for the diagnosis of thrombosis? *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34: 33-38
- Walker FJ, Esmon CT. Interactions between heparin and factor Xa: Inhibition of prothrombin activation. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 585: 405-415
- Walter U, Geiger J, Haffner C, Markert T, Nehls C, Silber RE, Schanzenbächer P. Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors. *Agents Actions Suppl.* 1995; 45: 255-268
- Warkentin TE. Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; 17: 105-125
- Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996; 47: 315-331
- Wu SM, Cheung WF, Frazier D, Stafford DW. Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science.* 1991; 254: 1634-1636
- Yan AC, Levy M. Aptamers and aptamer targeted delivery. *RNA Biol.* 2009; 6: 316-320

## 8 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Pöttsch für die Unterstützung und die fachkundige Betreuung bedanken. Besonderen Dank gilt auch Herrn PD Dr. Jens Müller, der mit seiner Hilfe und Ratschlägen jeder Zeit zur Verfügung stand. Die gemeinsamen konstruktiven Diskussionen haben mit einem großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken. Meinen Mitdoktoranden möchte ich für die vielen tollen gemeinsamen Stunden im Labor danken. Ohne sie wäre die Arbeit nicht so angenehm und abwechslungsreich gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihr Vertrauen und ihre Unterstützung hätte ich meinen bisherigen Lebensweg nicht gehen können. Euch widme ich diese Arbeit. Ebenso danke ich meinen Geschwistern und Freunden, die alle auf die eine oder andere Art etwas für den Erfolg dieser Arbeit geleistet haben.