

**Untersuchungen des Einflusses verschiedener Liganden auf die
Inaktivierungskinetik von aktiviertem Protein C (APC)**

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

Julia Janina Zimmermann
Bonn
2015

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Jens Müller
2. Gutachter: apl.-Prof. Dr. Michael Ludwig

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.08.2015

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	10
1.1 Einführung.....	10
1.2 Physiologie der Hämostase.....	10
1.2.1 Primäre Hämostase.....	10
1.2.2 Sekundäre Hämostase.....	12
1.2.3 Fibrinolyse.....	15
1.3 Regulationsmechanismen und Störungen der Hämostase.....	16
1.3.1 Physiologische Regulationsmechanismen der Hämostase.....	16
1.3.2 TFPI-System.....	17
1.3.3 Antithrombin-Heparin-System.....	18
1.3.4 Protein C/S System.....	19
1.3.4.1 Aktivierung von Protein C.....	19
1.3.4.2 Wirkung von APC.....	20
1.3.4.3 Protein S als Cofaktor von Protein C.....	21
1.3.4.4 Inhibition und Regulation von APC.....	22
1.3.5 Regulation der Fibrinolyse.....	23
1.4 Gerinnungsstörungen.....	23
1.4.1 Antithrombin-Mangel.....	24
1.4.2 Protein C-Mangel.....	24
1.4.3 Protein S-Mangel.....	25
1.4.4 APC-Resistenz/FV-Leiden.....	25
1.4.5 Gerinnungsstörungen bei Sepsis.....	27

1.5	Medikamentöse Regulation der Hämostase.....	29
1.5.1	Antikoagulanzen – Heparine.....	29
1.5.1.1	Unfraktioniertes Heparin	29
1.5.1.2	Niedermolekulare Heparine.....	30
1.5.1.3	Danaparoid-Natrium (Orgaran®).....	30
1.5.1.4	Fondaparinux-Natrium (Arixtra®)	31
1.5.2	Rekombinantes APC (Xigris®).....	31
1.5.2.1	Wirkmechanismus.....	31
1.5.2.2	Studienbeschreibung.....	32
1.6	Aptamere	34
1.6.1	Selektion von Aptameren.....	34
1.6.2	Diagnostische und therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren .	35
1.6.3	Aptamere gegen Gerinnungsfaktoren.....	36
1.6.4	Aptamere gegen APC.....	37
1.7	Zielsetzung	38
2.	Materialien	40
2.1	Verwendete Chemikalien.....	40
2.2	Verwendete Reagenzien.....	40
2.3	Verwendete Pufferlösungen	43
2.3	Verwendete Materialien	45
2.4	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	45
3.	Methoden	47
3.1	Allgemeine Versuchsprinzipien.....	47
3.1.1	Einleitung	47
3.1.2	Enzyme-Capture-Assay	47

3.1.3	APC-PCI-Komplex-ELISA.....	50
3.1.4	Captured-Enzyme-Assay	50
3.2	Versuchsdurchführung	51
3.2.1	Enzyme-Capture-Assay	51
3.2.1.1	Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten.....	51
3.2.1.2	Auftragen des Aptamers	52
3.2.1.3	Auftragen der Proben und Standardkurve	52
3.2.1.4	Auftragen des fluorogenen Substrates	54
3.2.1.5	Messung der generierten Fluoreszenz	54
3.2.2	APC-PCI-Komplex-ELISA.....	54
3.2.3	Captured-Enzyme-Assay	56
3.2.3.1	Vorbereitung der Platte	56
3.2.3.2	Auftragen der Proben	57
3.2.3.3	Auftragen des flourogenen Substrates und Messung der Fluoreszenz	57
3.2.3.4	Nachweis der APC-PCI-Komplexe.....	57
3.3	Vorversuche zur Testetablierung.....	58
3.3.1	Herstellung der Proben.....	58
3.3.2	APC-PCI-Komplex-ELISA.....	60
4.	Ergebnisse	64
4.1	Vergleich der Plasma-Halbwertszeiten von rAPC und pAPC	64
4.2	Einfluss von Heparin auf die APC-Halbwertszeit.....	67
4.2.1	Einfluss von unfraktioniertem Heparin (UFH, Liquemin [®]).....	67
4.2.2	Einfluss verschiedener Heparine mit unterschiedlichen Molekulargewichten	69
4.2.3	Direkter Vergleich des Einflusses verschiedener Heparine	71
4.3	Einfluss von Aptameren auf die Halbwertszeit von rAPC.....	77

4.4	Einfluss von Protein S auf die Halbwertszeit von rAPC.....	80
5.	Diskussion	88
5.1	Vergleich von pAPC und rAPC	88
5.1.2	Bestimmung der Plasma-Halbwertszeiten von pAPC und rAPC.....	88
5.1.2	Komplexbildung von rAPC und pAPC mit PCI.....	91
5.2	Einfluss verschiedener Heparine auf die APC-Halbwertszeit.....	91
5.2.1	Einfluss von unfraktioniertem Heparin (UFH, Liquemin®).....	92
5.2.2	Einfluss verschiedener Heparine mit unterschiedlichen Molekulargewichten	93
5.2.3	Direkter Vergleich des Einflusses verschiedener Heparine	95
5.3	Klinische Relevanz des Einflusses von Heparinen auf die APC-Halbwertszeit...	97
5.4	Einfluss der DNA-Aptamere auf die APC-Halbwertszeit	99
5.5	Einfluss von Protein S auf die APC-Halbwertszeit	100
6.	Zusammenfassung und Ausblick	103
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Danksagung	133

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α_1 -PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
α_2 -AP	α_2 -Antiplasmin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Arg	Arginin
BSA	Bovines Serumalbumin
AT	Antithrombin
C4BP	C4-bindendes Protein
C4BP β^+	C4BP-enthaltende β -Kette
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
Da	Dalton
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DrotAA	Drotrecogin alfa
E. coli	Escherichia coli
ECA	Enzyme-Capture-Assay
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
FG	Fibrinogen

FDA	Food and Drug Administration
FP	Fibrinopeptid
FU	Fluorescence Units
GA	Glykoantikoagulanzen
GAG	Glykosaminoglykan- Glykoantikoagulanzen
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HWZ	Halbwertszeit
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
K_i	Inhibitorische Konstante
K_d	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
kDA	Kilodalton
L	Liter
LDL	Low-density Lipoprotein
log	Logarithmus
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MODS	Multi organ disfunction syndrome
M_r	Molekülmasse
Nf- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMH	Niedermolekulares Heparin
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
OECA	Oligonucleotid Enzym Capture Assay

PA	Plasminogenaktivator
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAR1	Protease aktivierender Rezeptor 1
PC	Protein C
PCI	Protein C Inhibitor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PF4	Plättchenfaktor 4
pmol	Picomol
PROWESS	Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis
PS	Protein S
rAPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
ssDNA	Single stranded Desoxyribonukleinsäure
TAIF	Thrombinaktivierbarer Fibrinolyseinhibitor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor pathway inhibitor
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
t-PA	Tissue-type Plasminogenaktivator
TSE	Transmissible spongiform encephalopathies
UFH	Unfraktioniertes Heparin
u-PA	Urinary-type Plasminogenaktivator
Val	Valin
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Blutgerinnung (Hämostase) ist ein lebenswichtiger Prozess, der zum Verschluss von Verletzungen in der Gefäßwand führt. Im Falle einer solchen Verletzung muss die Hämostase ausreichend rasch einsetzen, um den drohenden Blutverlust möglichst gering zu halten. Dabei muss sie jedoch auf den Bereich einer Verletzung begrenzt bleiben. Bei unversehrter Gefäßwand wird die Aktivierung der Hämostase und eine damit verbundene Bildung eines Gerinnsels (Thrombus) verhindert. Hierzu bedarf es einer engen Regulierung. Die Gesamtheit der an der Blutgerinnung, ihrer Regulation, und der Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) beteiligten Elemente des Organismus und ihre Interaktionen bilden das Hämostasesystem. Eine übliche Gliederung dieser Elemente anhand der Prozesse, an denen sie beteiligt sind, ist die Unterscheidung in primäre und sekundäre Hämostase sowie Fibrinolyse.

1.2 Physiologie der Hämostase

1.2.1 Primäre Hämostase

Die Hauptrolle in der primären Hämostase spielen die Thrombozyten, welche über Adhäsionsmechanismen verfügen, die sie dazu befähigen, Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktionen einzugehen. Diese Eigenschaft ist für ihre Fähigkeit, Blutungen zu stoppen und Gefäßreparationen zu fördern unabdinglich. Die Hauptfunktionen der Thrombozyten lassen sich in Adhäsion, Aggregation und Sekretion unterteilen (Abb. 1).

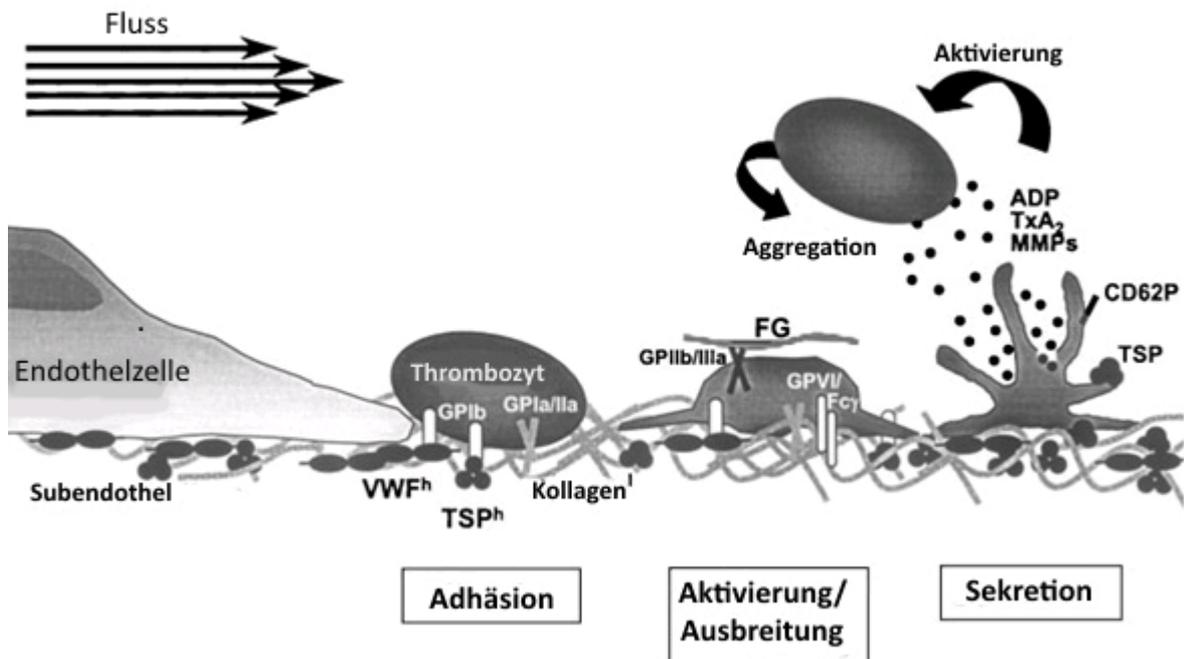


Abb. 1: Die zelluläre Hämostase ist durch die Adhäsion (adhesion), Aktivierung (activation/spreading), Sekretion (secretion) von Mediatoren und Aggregation (attraction) weiterer Thrombozyten gekennzeichnet (Jurk und Kehrel, 2005).

Die Adhäsion der Thrombozyten an das beschädigte Subendothelium wird vor allem über die Bindung von Glykoproteinen (GP) auf der Thrombozytenmembran an Kollagene via vWF und Thrombospondin vermittelt. Die aktivierten GPIIb/IIIa binden nun Fibrinogen (FG), das nach seiner Spaltung zu Fibrin einen wichtigen Anteil an der Thrombusstabilität hat. Durch die Sekretion von ADP, Thromboxan A₂ (TxA₂) sowie der Präsenz von Thrombospondin auf der Thrombozytenmembran kommt es zu einer Aktivierung und Anheftung weiterer Thrombozyten.

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten ohne stabile Verbindungen einzugehen, da das Endothel, welches die Gefäßwand auskleidet, über anti-adhäsive Eigenschaften verfügt. Als Gatekeeper zwischen Blut und Gewebe verhindert das Gefäßendothel die Gerinnselbildung und erhält somit den Blutfluss aufrecht (van Hinsbergh, 2012). Kommt es jedoch zu einer Verletzung des Gefäßendothels, werden subendotheliale Strukturen freigelegt, die mit den zellulären und plasmatischen Elementen des Hämostasesystems im Blut wechselwirken.

Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieses multimere Glykoprotein bindet an bei einer Verletzung freigelegtes subendotheliales Kollagen. Der Von-Willebrand-Faktor liegt im Plasma in glomerulärer Form vor, entfaltet sich jedoch nach Bindung an Kollagen unter dem Einfluss der Scherkräfte des fließenden Blutes (Ruggerie, 2007). Durch diese Strukturänderung ist eine Bindung von

Thrombozyten an den Von-Willebrand-Faktor über den Glykoprotein (GP)-Ib-IX-V-Komplex der Thrombozytenoberfläche möglich. Die Bindung von Thrombozyten an Kollagen wird über weitere Glykoproteine wie die Kollagenrezeptoren GP VI und GP Ia-IIa sowie den Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa vermittelt (Ruggerie et al., 2007). Nach diesem als Thrombozytenadhäsion bezeichneten Vorgang verändern die Thrombozyten ihre Form. Während sie in der Zirkulation in einer inaktiven Ruheform vorliegen, kommt es nun zur Thrombozytenaktivierung, bei der sich diese morphologisch verändern und Pseudopodien ausbilden (Li et al., 2010).

An diesem Prozess sind neben der Anheftung an Adhäsionsproteine auch Thrombozytenagonisten beteiligt, die bereits im Plasma vorliegen oder aus verschiedenen Speichern in den Thrombozyten freigesetzt werden (Ren et al., 2008). Nach Aktivierung sind die Thrombozyten dazu in der Lage, sich untereinander zu vernetzen und durch Verbindung mit weiteren Thrombozyten ein wachsendes Gerinnsel auszubilden. Diesen letzten Schritt der thrombozytären Hämostase bezeichnet man als Thrombozytenaggregation (Ruggerie et al., 2007).

1.2.2 Sekundäre Hämostase

Im Zentrum der sekundären oder plasmatischen Hämostase stehen die Gerinnungsfaktoren, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit römischen Zahlen nummeriert sind. Viele dieser Gerinnungsfaktoren sind Enzyme aus der Familie der Serinproteasen und zirkulieren im Blut als Vorläuferenzyme (Zymogene). Durch Spaltung der Zymogene kommt es zu einer kaskadenartigen Reaktion, an deren Ende die Abspaltung von Fibrin aus dem löslichen Plasmaprotein Fibrinogen durch Thrombin steht (Abb. 2). Man unterscheidet die als früher intrinsisch und extrinsisch bezeichneten Wege der Gerinnungseinleitung, die unabhängig voneinander aktivierbar, jedoch eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig amplifizieren können.

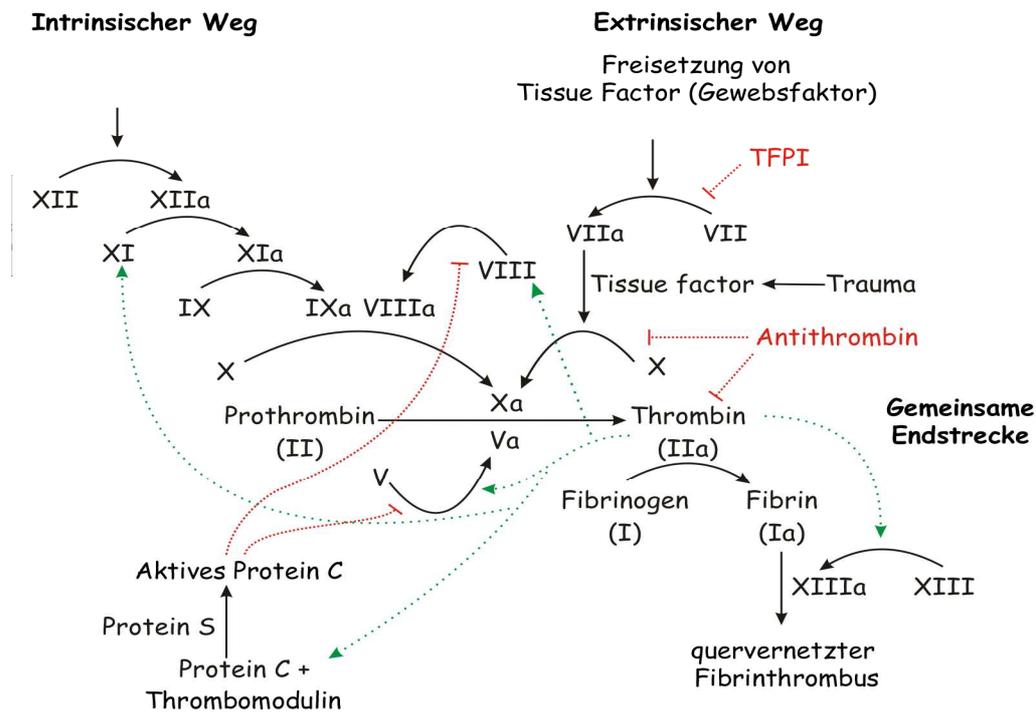


Abb. 2: Übersicht über den intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweg der sekundären Hämostase (Joe D, 2007)

Bei einer Verletzung der Gefäßwand kommt Blut mit subendothelial gelegenem Thromboplastin (auch Tissue Factor (TF) oder FIII) in Kontakt (früher als extrinsischer Weg bezeichnet). Dieses Membranprotein wird beispielsweise in der vaskulären Adventitia exprimiert, kommt aber auch in zirkulierenden Blutzellen vor und benötigt eine spezifische Signalkette, um die intravaskuläre Expression zu fördern. Wird genügend TF aus seinem „Ruhezustand“ geweckt, kommt es zur Gerinnung, anderenfalls wird die Gerinnelbildung durch die synergistischen Aktivitäten des TF pathway inhibitor (TFPI), Antithrombin und Protein C gestoppt (Butenas et al., 2009).

TF bildet einen Komplex mit FVII, welcher in seine aktive Form überführt wird (FVIIa/TF Komplex). Dieser Komplex wiederum aktiviert kleine Mengen an Faktor IX und X. Faktor Xa verbindet sich auf TF tragenden Zellen mit FVa zum Prothrombinasekomplex (Monroe et al., 1996). Dabei kann der FVa verschiedene Ursprünge haben: aktivierte Thrombozyten schütten teilweise aktivierten FV aus ihren α -Granula aus (Briede et al., 2001). Weiterhin kann FV auch von FXa oder nicht gerinnungsaktiven Proteasen aktiviert werden (Allen et al., 1995; Monkovic et al., 1990).

Faktor Xa befindet sich an der Zelloberfläche und ist dort von der Inaktivierung durch Plasmaproteaseinhibitoren relativ geschützt. Löst sich FXa von der Zelloberfläche, wird er sofort von TFPI oder Antithrombin (AT) inhibiert, was diesen Faktor effektiv auf die Oberfläche, an der er gebildet wurde, beschränkt. FIX hingegen kann sich von TF-tragenden Zellen zu nahegelegenen Thrombozyten oder anderen Zelloberflächen bewegen, da er nicht von TFPI und viel langsamer von AT inhibiert wird als FXa (Monroe et al., 2006). Bei der Aktivierung von FVII werden kleine Mengen Thrombin (FIIa) gebildet, das wiederum Thrombozyten aktiviert. Obwohl diese schon an den Ort der Verletzung gebunden und teilweise aktiviert sind, führt Thrombin zu einer höheren prokoagulativen Aktivität als die Adhäsion allein (Lane et al., 2006). Außerdem werden durch diese kleine Mengen Thrombin auch die Cofaktoren V und VIII auf der Thrombozytenoberfläche in ihren aktiven Zustand überführt (Schmaier, 1994; Schmaier, 2008).

Der von dem FVIIa/TF-Komplex gebildete FIXa bindet an der Thrombozytenoberfläche an FVIIIa. Zusätzlich wird FIXa von dem thrombozytengebundenen FXIa geliefert. Da sich FXa nicht aktiv von der TF-tragenden Zelle zum Thrombozyt bewegen kann, muss er direkt an der Thrombozytenoberfläche durch den FIXa/VIIIa-Komplex gebildet werden. Letztendlich verbindet sich FXa mit FVa an der Thrombozytenoberfläche und führt zu einer so starken Thrombingeneration, dass diese ausreichend ist, um Fibrin (FIa) zu koagulieren (Monroe et al., 2006). Fibrinogen wird in Fibrin umgewandelt, wobei zwei Fibrinopeptide (FP) abgespalten werden: FPA und FPB. Die Abspaltung von FPA erfolgt zuerst, wodurch ein Fibrinmonomer (Fibrin I) gebildet wird, welches spontan polymerisiert und Protofibrillen bildet. Durch die Abspaltung von FPB wird Fibrin II generiert, welches Quervernetzungen eingeht (Lane et al., 2005).

Die sogenannte Kontaktaktivierung (früher intrinsischer Weg) beschreibt die Eigenschaft des FXII, sich bei Exposition an negativ geladene Oberflächen wie Glas, Gelenkknorpel, Haut, Fettsäuren, oder Heparine (Schmaier, 1994) einer Autoaktivierung und Formveränderung zu Faktor XIIa zu unterziehen. Ein Teil des gebildeten FXIIa (Hageman-Faktor) ist nun in der Lage Kallikrein zu spalten, wodurch im Rahmen einer Amplifikation mehr FXII aktiviert und Bradikinin gebildet wird (Schmaier, 2008). Ein anderer Teil des FXIIa führt zu einer Umwandlung von FXI zu FXIa, welcher Teil einer thrombingenerierenden Feedbackschleife ist, die über FIX-Aktivierung die Verstärkung

der Koagulation fördert (Naito et al., 1991, Gailani et al., 1991, von dem Borne et al., 1995). Wie schon oben beschrieben, kommt es durch eine Komplexbildung aus FIXa und dem durch Thrombin aktivierten FVIIIa zur Spaltung von FX. Weitere wichtige Bestandteile dieses sogenannten intrinsischen Tenasekomplexes sind neben FVIIIa und FIXa Calciumionen und Phospholipide der Thrombozytenmembran.

Zu erwähnen sei noch die Transglutaminase FXIII, welche durch Thrombin gespalten wird und die Bildung kovalenter Bindungen der Fibrinpolymere katalysiert, was wesentlich zur Stabilität des Gerinnsels beiträgt (Lord, 2011).

1.2.3 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse ist ein wichtiger, körpereigener Mechanismus zur Auflösung eines Blutgerinnsels. Sie kommt bei der Begrenzung der Gerinnselbildung, sowie bei der Rekanalisation eines durch einen Thrombus verschlossenen Blutgefäßes zum Tragen.

Das Plasminogenaktivator (PA)-System kontrolliert die Bildung und Aktivität von Plasmin und spielt somit eine wichtige Rolle in der Hämostase, Thrombose und weiteren biologischen Prozessen. Die zentrale Reaktion des PA-Systems ist die von Plasminogenaktivatoren vermittelte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin baut als Serinprotease Fibrin in seine Fibrinospaltprodukte ab (Fay et al., 2007), sodass sogenannte D-Dimere entstehen. Plasmin hat jedoch neben Fibrin auch noch einige andere Substrate wie Gerinnungsfaktoren, Zellrezeptoren, Metalloproteinasen und Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix (Cesarman-Maus et al., 2005; Myohanen et al., 2004). Somit spielt die Plasminogenaktivierung neben der Gerinnung auch in anderen biologischen Prozessen eine Schlüsselrolle, besonders in Prozessen, die Zelladhäsion und -migration beinhalten (Miles et al., 2005; Plow et al., 1999).

Plasminogen wird hauptsächlich in der Leber gebildet und verweilt primär im Plasma. Der gewebsspezifische Plasminogenaktivator (tissue-type PA, t-PA) und der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (urinary-type PA, u-PA) sind die beiden wichtigsten PAs. Sie aktivieren Plasminogen indem sie eine bestimmte Arg-Val Peptidbindung in der Proteasedomäne spalten (Fay et al., 2007). Dabei ist die Aktivierung über t-PA von der Anwesenheit bestimmter Cofaktoren wie Fibrin abhängig, welche bei der Bindung die Konformation des Plasminogens verändern (Koley et al., 2003). Die Bildung des

Plasminogens wird von PA-Inhibitoren, welche die t-PA und u-PA hemmen, streng überwacht. Insbesondere der PA-Inhibitor-1 (PAI-1) spielt dabei eine wichtige Rolle (Fay, 2004). α_2 -Antiplasmin inhibiert Plasmin dagegen direkt.

Für die Lösung des Gerinnsels muss sich Plasminogen an die Thrombusoberfläche binden. Die Bindung entsteht dabei zu Lysinresten des Fibrins über die Lysinbindungsstellen in den Kringle-domänen des Plasminogens (Cesarman-Maus, 2005). Während Plasmin durch Hydrolyse von Peptidbindungen Fibrin spaltet, werden C-terminale Lysinreste geschaffen, an die Plasminogen mit höherer Affinität als an interne Lysinreste bindet. Durch die Förderung der Plasminogenbindung an den sich auflösenden Thrombus wird die Fibrinolyse weiter beschleunigt (Fay et al., 2007).

Während der Gerinnelbildung wird auch der Thrombinaktivierbare Fibrinolyseinhibitor (TAFI) gebildet. Er ist eine als Zymogen im Plasma zirkulierende basische Carboxypeptidase, die proteolytisch von Thrombin aktiviert wird und C-terminale Lysinreste von Fibrin abspaltet (Wang et al., 1998). Somit hemmt aktivierter TAFI die Fibrinolyse durch Inhibition der Plasminogenbindung an teilweise abgebauten Fibrin und stellt einen wichtigen Faktor im Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse dar (Nesheim et al., 1997).

1.3 Regulationsmechanismen und Störungen der Hämostase

1.3.1 Physiologische Regulationsmechanismen der Hämostase

Als biologische Prozesse, die einen angemessenen Blutfluss aufrechterhalten, sind Hämostase und Fibrinolyse das Ergebnis einer komplexen Serie kaskadenartiger enzymatischer Reaktionen. Die in diesen Prozess involvierten Serinproteasen werden durch Feedbackschleifen, lokale Cofaktoren und Serinproteaseinhibitoren (Serpine) reguliert (Rau et al., 2007).

Serpine sind eine Superfamilie von Proteinen, die in 16 Stämme (A-P) eingeteilt werden. Der systematische Name jedes Serpins ist SERPINXy, wobei X für den Stamm und y für die Nummer innerhalb des Stammes steht (Law et al., 2006)

Die Gerinnung wird in erster Linie von dem Serpin Antithrombin (AT, SERPINC1), dem tissue factor pathway inhibitor (TFPI) und dem Protein C (PC) System geregelt.

1.3.2 TFPI-System

Der grundsätzliche Inhibitor der TF-initiierten Gerinnung ist der tissue factor pathway inhibitor (TFPI), welcher FXa-abhängig an den TF/FVIIa-Komplex bindet (Bajaj et al., 2001).

TFPI wird hauptsächlich im Endothel synthetisiert, ist ein 42-kDa schwerer Kunitz-Typ Protease-Inhibitor bestehend aus einem negativ geladenen N-Terminus, drei aufeinanderfolgenden Kunitz-Domänen und einem positiv geladenen C-terminalen Ende (Wun et al., 1988). Die erste Kunitz-Domäne bindet und inhibiert FVIIa, die zweite FXa und das C-terminale Ende bindet Heparin-ähnliche Strukturen an Gefäßwänden (Girard et al., 1989). Kunitz-3 beinhaltet eine Heparinbindungsstelle, deren Funktion noch unbekannt ist. In vielen verkürzten Formen ist diese Stelle jedoch an einer Disulfidbindung zwischen TFPI und low-density Lipoproteinen (LDL) beteiligt (Broze et al., 1994).

Da der TFPI in einen initialen Gerinnungsschritt eingreift, verhindert er, dass schon ein kleiner gerinnungsfördernder Schritt zu einer unkontrollierten Thrombingenerierung führt. Das heißt jedoch auch, dass ein Schwellenwert überschritten werden muss, bevor die TF/FVIIa induzierte Gerinnung überhaupt weiter ablaufen kann. Diese Schwellenwertüberschreitung kann beispielsweise eine FXa Produktion sein, die das inhibitorische Potential von TFPI übersteigt (Crawley et al., 2008).

In der Anfangsphase der Gerinnung werden nur kleine Mengen an FXa gebildet, welche die limitierte Thrombingenerierung erleichtern. Diese Anfangsphase wird stark durch den Einfluss von TFPI gehemmt. Danach wird der Effekt der positiven Feedbackschleife der Thrombingenerierung deutlich, die einen alternativen TF-unabhängigen Weg für die weitere Aktivierung von Prothrombin liefert (Mann et al., 2003).

Von Endothelzellen sekretierter TFPI zirkuliert im Plasma mit einer Konzentration von ≈ 2.5 nmol/L, wobei dieser Wert aufgrund des natürlichen zirkadianen Rhythmus zeitlich schwanken kann. Nach Heparin-gabe kann sich der Plasmaspiegel auf das 1,5 bis 3-fache erhöhen. Die Mehrzahl des im Plasma vorhandenen TFPI zirkuliert in einem an

LDL gebundenen Zustand und weist deswegen ein deutlich reduziertes inhibitorisches Potential gegenüber FXa und TF/FVIIa-Komplexen auf. Nur ca. 10% des Plasma TFPI zirkulieren frei in der vollen Länge von 43-kDa, die anderen Formen des TFPI haben abweichende molekulare Massen, entweder aufgrund eines Abbruchs am Carboxy-Ende oder aufgrund der Disulphidbindung an LDL. Die verkürzten Formen weisen dabei auch meist eine verminderte inhibitorische Aktivität auf (Crawley et al., 2008). Protein S (PS) wirkt als Cofaktor des TFPI und steigert die Hemmung von FXa durch TFPI um etwa das 10-fache (Hackeng et al., 2009).

Diese gerinnungshemmende Eigenschaft des Protein S wird besonders bei niedrigen TF-Konzentrationen um 1 pmol/L beobachtet, was vermuten lässt, dass es regulierend in die Anfangsphase der Gerinnung eingreift und kontinuierlichen Gerinnungsprozessen entgegenwirkt (Seré et al., 2004). Weiterhin setzt Protein S die halbmaximale inhibitorische Konzentration (K_i) von TFPI für die FXa/TFPI-Komplexbildung von 4,5 auf 0,5 nmol/L herunter, wodurch sie in den Bereich der Plasmakonzentration des TFPI in seiner vollen Länge gebracht wird (Hackeng et al., 2006).

Die C-terminal verkürzte TFPI-Form, die nur einen schwachen FXa-Inhibitor darstellt, wird nicht von Protein S stimuliert. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Interaktion zwischen Protein S und TFPI durch Kunitz-3 und das C-terminale Ende vermittelt wird (Hackeng et al., 2009).

1.3.3 Antithrombin-Heparin-System

Das Serpin Antithrombin (AT) reguliert die Serinproteinasen der Gerinnungskaskade. Dabei nimmt es eine Schlüsselrolle ein, indem es die Aktivierung koagulationsfördernder Proteinase außerhalb einer Gefäßverletzung hemmt. Die Funktion des Antithrombins wird wiederum von seinen Cofaktoren Heparin und Heparansulfat reguliert.

Antithrombin inhibiert die Zielproteinase sowohl über eine Substraterkennungssequenz innerhalb des aktiven Zentrums als auch über Exosite-Erkennungsdeterminanten außerhalb des aktiven Zentrums. Über diese Exosite-Erkennungsdeterminanten wird die Proteinase dazu geführt, einen Michaelis-ähnlichen Komplex zu bilden.

In den im Blut befindlichen Konzentrationen hemmt AT die Gerinnungsproteinasen sehr langsam, da es in einem unterdrückten reaktiven Zustand vorkommt. Heparin oder Glycosaminoglycane vom Heparansulfat-Typ wandeln AT in einen schnelleren Hemmstoff um, indem sie diese Unterdrückung aufheben (Olson et al., 2010). Heparansulfatmoleküle, die sich an der Oberfläche der Endothelzellen befinden, aktivieren zirkulierendes AT und sind somit für einen normalen nicht-thrombogenen Blutfluss verantwortlich (De Agostini et al., 1990; Macrum et al. 1986). Da ein Gerinnungsprozess an den Ort der Gefäßverletzung gebunden sein soll, wird zusätzlich Heparin von extravaskulären Mastzellen ausgeschüttet, was eine schnelle Inaktivierung der Gerinnung außerhalb der Gefäßverletzung erlaubt und die Thrombusausbreitung verhindert (Olson et al., 2010).

Heparin und Heparansulfat aktivieren AT allosterisch, indem sie es durch ein sequenzspezifisches Pentasaccharid binden und eine Konformationsänderung herbeiführen (Petitou et al., 2003; Olson et al., 2002). Es kommt zu einer erhöhten Reaktion mit Faktor Xa, IXa und Thrombin, die somit inaktiviert werden.

1.3.4 Protein C/S System

1.3.4.1 Aktivierung von Protein C

Protein C (PC) ist ein in der Leber synthetisiertes, Vitamin K-abhängiges Glykoprotein, das als zweikettige biologisch inaktive Form im Plasma zirkuliert (Stenflo et al., 1982).

Es wird durch Thrombin-vermittelte Spaltung am N-Terminus in seine aktive Form aktiviertes Protein C (APC) überführt. Eine effektive Aktivierung erfordert dabei das Transmembran-Glykoprotein Thrombomodulin (TM) als Cofaktor für Thrombin, welcher die Aktivierung über 1000fach verstärkt (Esmon et al., 1982).

Thrombomodulin (TM) ist ein von vaskulären Endothelzellen synthetisiertes und an der Zelloberfläche exprimiertes Glykoprotein. An TM gebunden ändert sich die Substratspezifität des Thrombins: Seine Fähigkeiten Fibrin zu spalten, Cofaktoren zu aktivieren und die Thrombozytenaktivierung einzuleiten sind bei einer Bindung an TM herabgesetzt (Van de Wouwer et al., 2004). Die PC Aktivierung durch den Thrombin-TM-Komplex wird noch einmal um das 20-fache verstärkt, wenn PC an den

endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) gebunden ist (Stearns-Kurosawa et al., 1996). Der Plättchenfaktor 4 (PF4) kann die PC Aktivierung zusätzlich beschleunigen, indem er eine Konformationsänderung im PC bewirkt und somit seine Affinität zum Thrombin-TM-Komplex erhöht (Slungaard et al., 2003).

Thrombomodulin, APC und EPCR haben dabei nicht nur gerinnungshemmende Eigenschaften, sondern spielen auch in Entzündungsprozessen, Fibrinolyse und Zellproliferation eine Rolle (Van de Wouwer et al., 2004).

1.3.4.2 Wirkung von APC

APC unterdrückt als natürlicher Gerinnungshemmer die weitere Thrombingenerierung, indem es die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa proteolytisch spaltet, wobei dieser Vorgang durch seinen Cofaktor Protein S (PS) beschleunigt wird. Weiterhin steigert APC durch die Neutralisierung von PAI-1 die fibrinolytische Aktivität (Van de Wouwer et al., 2004). Durch seine zytoprotektive Aktivität wird außerdem die Exposition gerinnungsfördernder zellulärer Membranoberflächen auf Zellen eingeschränkt.

Neben dieser gerinnungshemmenden Eigenschaft verhindert APC die Apoptose, schwächt Entzündungen ab, erhöht die Barrierenfunktion des Endothels und reguliert einige Gene, die eine Rolle in der Krankheitsprogression spielen, herunter. Die meisten dieser Funktionen laufen über eine proteolytische Spaltung des Protease aktivierenden Rezeptors 1 (PAR1) nach Bindung an den EPCR ab, zusätzlich unterstützt CD11b die APC Signalübertragung (Esmon, 2012).

Die antiinflammatorischen Eigenschaften des APC lassen sich mit verschiedenen Mechanismen erklären. Zum einen kommt es durch seine Interaktion mit den Faktoren Va und VIIIa zu einer Herunterregulierung der Thrombingeneration. Somit greift APC in thrombininduzierte proinflammatorische Geschehen ein, welche die Thrombozytenaktivierung, zytokininduzierte Chemotaxis der Monozyten und Neutrophilen und die Hochregulation der leukozytären Adhäsionsmoleküle beinhalten (Bizios et al., 1986; Drake et al., 1992). Zusätzlich schwächt APC Entzündungen direkt ab, indem es die Monozyten/Makrophagen Expression von TF und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die Nf- κ B Translokation, Zytokinsignalübertragung, TNF- α induzierte Hochregulation zelloberflächlicher leukozytärer Adhäsionsmoleküle und die Leukozyten-Endothelzell-Inter-

aktionen hemmt (Grey et al., 1994; Grinnell et al., 1994; Joyce et al., 2001; Murakami et al., 1996; Murakami et al., 1997).

Viele dieser Effekte werden durch die Aktivierung von PAR1 vermittelt (Riewald et al., 2002; Riewald et al., 2003; Sturnet al., 2003). Die APC induzierte PAR1 Aktivierung führt zu einer anderen zellulären Signalkette als die PAR1 Aktivierung durch Thrombin, obwohl in beiden Fällen die gleiche Stelle am Rezeptor gespalten wird (Riewald et al., 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Bindung von PC an den EPCR zu einer Migration des Rezeptors aus den Lipid Rafts heraus führt und zu diesem Zeitpunkt mit einem PAR1 interagiert, das an ein anderes G-Protein gebunden ist, was in einer anderen Signalkette resultiert (Bae et al., 2007 (a); Bae et al., 2007 (b); Bae et al., 2008).

Weiterhin schützt APC das Gefäßsystem, indem es die p53 vermittelte Apoptose in ischämischen zerebralen Gefäßen hemmt (Mosnier et al., 2003).

1.3.4.3 Protein S als Cofaktor von Protein C

Protein S (PS) ist ein Vitamin K-abhängiges Plasma Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 70 kDa (DiScipio et al., 1979; Lundwall et al., 1986). Es wird hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert, allerdings auch von Megakaryozyten, Endothelzellen, Leidigzellen des Hodens, Osteoblasten und vaskulären glatten Muskelzellen (Dahlbäck, 1991). Es zirkuliert mit einer Konzentration von etwa 25 mg/L im Plasma, wobei nur 40 % frei vorliegen und 60 % in Komplexen mit dem C4-bindenden Protein (C4BP). In dieser Komplexform verliert PS seine Funktion als Cofaktor von APC für die Degradierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa. In seiner freien Form dagegen unterstützt es den proteolytischen Abbau der Faktoren und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulierung der Thrombingeneration (Rezende et al., 2004).

Die hohe Affinität zwischen PS und negativ geladenen Phospholipidoberflächen ist für die APC-abhängige Funktion besonders wichtig. Sie wird durch die Calcium-induzierte Faltung der Amino-terminalen Gla-Domäne gewährleistet (Furie et al., 1999; Stenflo et al., 1999).

In der flüssigen Phase konnten bislang noch keine direkten Interaktionen zwischen APC und PS nachgewiesen werden, wohingegen sie auf negativ geladenen Lipidoberflächen

einen 1:1 stöchiometrischen Komplex bilden können (Walker, 1984). Die Bildung dieses Komplexes erhöht die Membranaffinität von APC und ist somit einer der Mechanismen, durch die PS die Aktivität von APC verbessert (Walker, 1980).

Zusätzlich besitzt PS APC-unabhängige gerinnungshemmende Eigenschaften, indem es sowohl den Prothrombinase- als auch den Tenasekomplex direkt hemmt. Dabei liegt der Mechanismus vermutlich in der kompetitiven Natur um das Protein (Hackeng et al., 1994; Heeb et al., 1993; Heeb et al., 1994; Koppelman et al., 1995) und/oder um Phospholipidbindungsstellen (van Wijnen et al., 1996), sowie in der Umkehr der protektiven Eigenschaft, die FXa bei FVa-Inaktivierung aufweist (Solymoss et al., 1988). Weiterhin beschleunigt PS die APC-vermittelte Neutralisation von PAI-1, wodurch die Thrombuslyse gesteigert wird (de Fouw et al., 1986) und verbessert die Eigenschaften des TFPI (Hackeng et al., 2006; Ndonwi et al., 2008).

1.3.4.4 Inhibition und Regulation von APC

Die proteolytische Aktivität von APC im Plasma wird vor allem von den Serpinen Protein C Inhibitor (PCI), Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -PI) reguliert (Heeb et al., 1988; Pratt et al., 1993; Sakata et al., 1986). Auch der nicht-Serpin Inhibitor α_2 -Makroglobulin trägt zur Regulation der APC-Aktivität bei (Heeb et al., 1991). APC reagiert mit allen diesen Inhibitoren jedoch sehr langsam, was ihm eine lange Halbwertszeit (HWZ) von 20-25min gewährt (Heeb et al., 1988; Heeb et al., 1991). Die Cofaktoren Heparin und Vitronektin beschleunigen jedoch die Reaktion von APC mit PCI und PAI-1 (Pratt et al., 1993; Rezaie, 2001).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die EPCR-vermittelte Endozytose, welche die Transzytose der Protease und seine Entfernung aus der Zirkulation erleichtert (Iakhsaev et al., 2007; Nayak et al., 2009).

Hochmolekulare Heparine können die Inhibitions geschwindigkeit von APC durch PCI in Anwesenheit von physiologischen Ca^{2+} Konzentrationen um das Dreifache erhöhen (Rezaie, 2003), was zu einer negativen Bilanz in der Therapie mit Heparinen bei schwerer Sepsis führen kann. Die heparinvermittelte Beschleunigung der APC-Inhibition durch PCI benötigt dieselbe basische Exosite, die auch entscheidend für die PC-Aktivierung durch den Thrombin-TM-Komplex und die gerinnungshemmende Eigenschaft des Protease ist (Rezaie, 2003).

1.3.5 Regulation der Fibrinolyse

Sowohl t-PA als auch u-PA werden von spezifischen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAIs) reguliert. Die wichtigsten PAIs sind PAI Typ 1 (PAI-1), ursprünglich bekannt als Endothelzell-PAI (Loskutoff et al., 1983), PAI Typ 2 (PAI-2), auch bekannt als der plazentale PAI-Typ (Kruithof et al., 1986; Kruithof et al., 1995) und PAI Typ 3 (PAI-3), der identisch zu PCI ist (Espana et al., 1989; Heeb et al., 1987).

Unter den inhibitorischen Faktoren ist PAI-1 der wichtigste Inhibitor der Fibrinolyse. Er ist ein einkettiges 48 kDa schweres Serpin und wird von Endothelzellen, Megakaryozyten, glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Adipozyten, dem Endometrium, Peritoneum, Hepatozyten, Mesothelzellen und kardialen Myozyten synthetisiert (Loskutoff et al., 1983; Zorio et al., 2008). Einmal synthetisiert wird PAI-1 hauptsächlich in Thrombozyten gelagert, kann jedoch auch in den Blutfluss sekretiert oder in der subendothelialen Matrix deponiert werden (Cesari et al., 2010). Wird es in den Blutstrom entlassen, kann es in aktiver Form vorkommen oder in einem häufiger vorkommenden Komplex mit t-PA oder Vitronektin, ein relativ thermostabiles Glykoprotein, welches PAI-1 stabilisiert und in seine aktive Form überführen kann (Kohler et al., 2000; Loskutoff et al., 1998).

α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) ist mit einer Konzentration von ungefähr $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($1 \mu\text{M}$) im Plasma vorhanden und ist der wichtigste physiologische Inhibitor von Plasmin, welches in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ vorliegt (Wiman et al., 1977). Es formt einen Serpin-Enzym-Komplex mit Plasmin, wird jedoch von der Anwesenheit N- und C-terminaler Erweiterungen aktiviert, welche einzigartig in der Serpinfamilie sind. Dabei ist die Verbindungsrate mit $2 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ sehr hoch, vergleichbar mit der Assoziationsgeschwindigkeit von Antithrombin und Thrombin in Anwesenheit von unfraktioniertem Heparin (Coughlin, 2005).

1.4 Gerinnungsstörungen

Die physiologischen Vorgänge der Hämostase nach einer Verletzung können in jeder Phase gestört sein, so dass es zu einer Blutungs- oder Thromboseneigung mit einer Vielzahl möglicher zugrunde liegender Störungen kommen kann. Im Nachfolgenden

werden hiervon der Antithrombinmangel, der Protein C/S Mangel, die FV-Leiden-Mutation und sekundäre Gerinnungsstörungen im Rahmen einer Sepsis näher beschrieben.

1.4.1 Antithrombin-Mangel

Der heterozygote Typ 1 AT-Mangel ist mit 1:2000 Fällen relativ selten in der Gesamtbevölkerung und mit einem 10-fach erhöhten Thromboserisiko verbunden. Nur 1%-2% der Thrombosepatienten weisen diesen Mangel auf (Dahlbäck, 2008). Es wurden eine Vielzahl von Mutationen (Missense, Nonsense, Deletionen) im AT-Gen beschrieben, die entweder zu funktionellen Defekten oder niedrigen Plasmaspiegeln führten (van Boven et al., 1997; Rau et al., 2007). Ein Typ 1 homozygoter AT-Mangel wurde bisher nicht beschrieben, was vermuten lässt, dass ein kompletter AT-Mangel nicht mit dem Leben vereinbar ist. Diese Theorie wird von dem letalen Phänotyp, der bei Knockout Mäusen beobachtet werden konnte, unterstützt (Ishiguro et al., 2000).

1.4.2 Protein C-Mangel

Ein homozygoter Protein C Mangel führt aufgrund erheblicher intravaskulärer Thrombosierung der Mikrozirkulation zu schweren Fällen neonataler Purpura Fulminans (Branson et al., 1983). Die Vielzahl der Protein C Mangelerkrankungen kann dabei grundsätzlich in zwei Klassen eingeteilt werden (Typ I und Typ II). Der Typ I umfasst Fälle mit verminderter Protein C Konzentration, während bei dem Typ II normale Proteinkonzentrationen vorliegen, die jedoch eine geringe Protein C Aktivität aufweisen (Dahlbäck, 2008). Unter den Thrombosepatienten kommt der Protein C Mangel etwas häufiger vor als der AT-Mangel, jedoch immer noch bei weniger als 5 % der Patienten (Heijboer et al., 1990; Gladson et al., 1988; Malm et al., 1992; Miletich 1990). Allerdings führt dieser Mangel alleine nicht zu einem schweren Thromboserisiko. Obwohl er mit 1:250 sogar relativ häufig bei Blutspendern vorkommt, führt er bei ihnen und Familienangehörigen mit einem ebenfalls vorhandenen Protein C-Mangel nicht zu einem erhöhten Risiko (Miletich et al., 1987). Diese Entdeckung ließ darauf schließen, dass der Protein C-Mangel alleine ein eher milder Risikofaktor ist und Familien, welche ein

erhöhtes Thromboserisiko und einen Protein C-Mangel aufwiesen noch einen anderen genetischen Faktor in sich tragen müssen, der das Risiko erhöht (Miletich et al., 1993).

1.4.3 Protein S-Mangel

Der Protein S-Mangel kann in drei Typen unterteilt werden. Wenn sowohl das freie, als auch das gesamte Protein S erniedrigt sind, spricht man von einem Typ I-Mangel. Bei Typ II handelt es sich um einen funktionellen Mangel, welcher in nur wenigen Fällen beschrieben wurde. Bei einem Typ III-Mangel ist nur das freie Protein S erniedrigt, während das C4BP-gebundene und gesamte Protein S normal ist (Dahlbäck, 2008). Die Unterscheidung zwischen Typ I und Typ III war für viele Jahre schwierig, da einige Familien beide Mangelformen aufwiesen, welche mit derselben Genmutation assoziiert waren. Dies lässt vermuten, dass die beiden Typen phänotypische Varianten desselben Protein S-Defektes sind (Zoller et al., 1995). Die molekulare Erklärung hierfür liefert die Analyse der Plasmakonzentrationen von Protein S und der C4BP-enthaltenden β -Kette (C4BP β^+). Unter normalen Bedingungen übersteigt die Protein S-Konzentration die der C4BP β^+ um 30 % bis 40 %. Die beiden Proteine binden mit einer sehr hohen Affinität aneinander, mit dem Ergebnis, dass das freie Protein S der molare Überschuss von Protein S über C4BP β^+ ist (Dahlbäck, 2008). Die milde Form des Protein S-Mangels zeichnet sich folglich durch einen selektiven Mangel des freien Protein S aus, während schwerere Fälle zusätzlich verminderte Protein S-Komplexe und somit verminderte Level des gesamten Protein S aufweisen (Simmonds et al., 1997; Simmonds et al., 1998; Zoller et al., 1995).

1.4.4 APC-Resistenz/FV-Leiden

In Studien, die in den 80er Jahren bei Thrombosepatienten durchgeführt wurden, konnten AT-, Protein C- und Protein S-Mangelercheinungen bei weniger als 10% der Patienten identifiziert werden, obwohl es in bis zu 40 % der Fälle eine positive Familienanamnese gab (Heijboer et al., 1990; Gladson et al., 1988; Malm et al., 1992). Dies deutete darauf hin, dass noch andere Risikofaktoren beteiligt sein müssen. 1993 gelang mit der Entdeckung der APC-Resistenz diesbezüglich ein Durchbruch (Dahlbäck

et al., 1993). Eine Schlüsselentdeckung dabei war, dass die Zugabe von APC zu Patientenplasma in entsprechenden Gerinnungstesten nicht zu der erwarteten Verlängerung der Gerinnungszeit führte, was zu dem Begriff APC-Resistenz als phänotypische Beschreibung dieses Zustandes führte (Dahlbäck, 2008). Nachfolgende Studien zeigten, dass die APC-Resistenz sowohl in der Familie des Patienten als auch in anderen untersuchten thromboseanfälligen Familien ererbt war (Dahlbäck et al., 1993). In weiteren Studien wurde die APC-Resistenz bei 20 %-60 % der Thrombopatienten gefunden und zeigte sich auch unter der gesunden Kontrollgruppe mit 5 %-10 % als relativ häufig (Griffin et al., 1993; Koster et al., 1993; Svensson et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der zugrunde liegende Mechanismus der APC-Resistenz bei allen Individuen mit dieser Resistenz identisch war (Svensson et al., 1994). Die Resistenz konnte durch Zugabe von FV überspielt werden, was zu der Vermutung führte, dass sie durch eine Punktmutation im FV-Gen hervorgerufen wird (Dahlbäck et al., 1994). Diese Mutation an Arg506 wird als FV-Leiden bezeichnet, da Bertina et al. aus der niederländischen Stadt Leiden die ersten waren, die diese Mutation beschrieben (Bertina et al., 1994). Die Veränderung führt dabei nicht nur zu einem gestörten Abbau von FVa, sondern auch von FVIIIa, da FV nach initialer Spaltung an Arg506 durch APC ebenfalls eine Rolle als Cofaktor während der APC-abhängigen Inaktivierung von FVIIIa zukommt (Shen et al., 1994; Thorelli et al., 1999; Varadi et al., 1995; Varadi et al., 1996).

Die Prävalenz des FV-Leidens zeigt starke Schwankungen in verschiedenen Populationen, die von 0 % bis zu 15 % in der gesunden Bevölkerung reichen (Rees et al., 1995; Segers et al., 2007). Dabei weisen alle Individuen mit FV-Leiden denselben genetischen Haplotyp für FV auf, was auf einen founder effect schließen lässt (Dahlbäck, 2008). Heterozygot Betroffene weisen einen lebenslang hyperkoagulativen Zustand auf, welcher mit einem 5-fach erhöhten Risiko für venöse Thrombosen verbunden ist. Das Risiko ist für homozygot Betroffene noch einmal deutlich größer, die Gefahr für venöse Thrombosen ist hier schätzungsweise 50-fach erhöht (Dahlbäck, 1995; Emmerich et al., 2001; Rosendaal, 1999). Die häufigsten klinischen Manifestationen bestehen in venösen Thrombosen und infolge dessen pulmonalen Embolien. Für arterielle Thrombosen ist die FV-Leiden-Mutation allerdings kein Risikofaktor (Juul et al., 2002; Ridker et al., 1995). Die hohe Prävalenz in bestimmten

Bevölkerungsgruppen lässt vermuten, dass die Mutation einen Überlebensvorteil darstellte. Dabei konnte gezeigt werden, dass es durch die FV-Leiden-Mutation zu einem geringeren Risiko für schwere Blutungen nach der Geburt kommt, was in der Entwicklungsgeschichte der Menschheit einen großen Überlebensvorteil geschaffen haben könnte (Lindqvist et al., 1999). Das hiermit erhöhte Thromboserisiko stellte vermutlich keinen starken negativen Überlebensfaktor dar, da Thrombosen erst relativ spät im Leben auftreten und somit die Fortpflanzung nicht beeinflussen (Dahlbäck, 2008).

1.4.5 Gerinnungsstörungen bei Sepsis

Die Sepsis ist die Haupttodesursache der nicht-kardiologischen Intensivstationen und entsteht durch eine übermäßige Aktivierung der inflammatorischen Abwehrmechanismen. Zu diesen Mechanismen gehört die Zytokinausschüttung, Aktivierung der Kaskadensysteme wie das Komplementsystem, das Kontakt-Phasen-, das Gerinnungs- und das fibrinolytische System.

Die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) tritt wie das multiple Organversagen (MODS, multi organ dysfunction syndrome) häufig als Komplikation bei der Sepsis auf. Die DIC ist ein erworbenes Syndrom, kommt bei 25-50 % aller Sepsispatienten vor und ist durch die Aktivierung der intravaskulären Gerinnung charakterisiert, welche zu einer Fibrinbildung und -ablagerung in den Mikrogefäßen führt (Zeerleder et al., 2005).

Die Aktivierung der Gerinnung wird von der sekundären Fibrinolyse oder in späteren Stadien der Inhibierung der Fibrinolyse begleitet (Levi et al., 1999; Ten Cate et al., 1999).

Die systemische Entzündung während einer Sepsis führt zu der Bildung proinflammatorischer Zytokine, welche die Aktivierung der Gerinnung und Fibrinolyse inszenieren. Sowohl die Gerinnungsaktivierung als auch die Herabregulation der Fibrinolyse werden hauptsächlich durch den Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 und IL-6 herbeigeführt (van der Poll et al., 1990; van der Poll et al., 1994). Zusätzlich beeinflusst TNF- α die Gerinnungsaktivierung über IL-6 (Hack et al., 1997). Das Kennzeichen der Gerinnungsstörung bei einer Sepsis ist das Ungleichgewicht zwischen intravaskulärer Fibrinbildung und seiner Entfernung. Eine stark reduzierte

antikoagulatorische Kapazität steht dabei einer massiven Gerinnungsaktivierung gegenüber, was letztendlich zu einer überwältigenden Fibrinbildung und mikrovaskulärer Thrombose führt (Levi et al., 1999).

Obwohl der initiale Trigger und die Dynamik variieren können, ist das klinische Bild der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks in den späteren Stadien durchaus einheitlich. Die Fibrinablagerung führt zu einer in fortschreitendem Organversagen endenden diffusen Obstruktion des mikrovaskulären Bettes. Es kommt zur Entwicklung renaler Insuffizienz, akutem Lungenversagen (ARDS, acute respiratory distress syndrome), Hypotension, zirkulatorischem Versagen und in manchen Fällen sogar zu diffuser Hautnekrose bis hin zum Gangrän der Extremitäten. Durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und die Beeinträchtigung der Fibrinabbauprodukte kann es zu diffusen Blutungen kommen.

Da die DIC an der Pathogenese der Sepsis und Entstehung des MODS beteiligt ist, stellt die Hemmung der Gerinnungsaktivierung eine wichtige therapeutische Option dar (Zeerleder et al., 2005). Mit drei randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studien wurde die Wirksamkeit von Antithrombin, APC und TFPI bei Sepsispatienten untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Anwendung von APC die Mortalität signifikant senken und die Diagnose erheblich verbessern konnte (Bernard et al., 2001). Aufgrund vermehrter Blutungsereignisse mit letalem Ausgang wurden diese Eigenschaften von rekombinant hergestelltem APC (rAPC, Xigris[®]) allerdings in der Folge in Frage gestellt (Rossi et al., 2013).

Die Funktion des APC-Systems ist während einer Sepsis stark herabgesetzt. Die verminderte APC-Aktivität wird dabei auf eine reduzierte TM-Expression, hervorgerufen durch Entzündungsmediatoren wie TNF- α , auf den Endothelzellen zurückgeführt (Moore et al., 1987; Moore et al., 1989). Zusätzlich steigt die Konzentration an C4BP, sodass weniger freies Protein S zur Verfügung steht, wodurch wiederum die APC-Funktion beeinträchtigt wird (Taylor et al., 1995).

Aufgrund seiner Rolle in der Pathogenese der Sepsis scheint die APC oder PC-Substitution eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit zu sein. In Tiermodellen stellte sich die Gabe von APC bereits als erfolgreich heraus (Taylor et al., 1987). Auch gab es schon einige Fälle und unkontrollierte Studien zu der Gabe von PC bei Patienten mit Meningokokkensepsis mit vielversprechenden Ergebnissen: Die PC-Verabreichung

fürte zu einer Abschwächung der DIC, Verbesserung des MODS und einer reduzierten Progression der Hautläsionen und Amputationshäufigkeit. Die Mortalität bei den behandelten Patienten war zudem niedriger als erwartet (Alberio et al., 2001). Eine weitere Studie (Rintala et al., 2000) zeigte aussichtsreiche Ergebnisse bezüglich der PC-Substitution bei mit Purpura Fulminans assoziierter Sepsis.

1.5 Medikamentöse Regulation der Hämostase

1.5.1 Antikoagulanzen – Heparine

Heparine gehören zu der Gruppe der Glykoantikoagulanzen (GA) und sind körpereigene bzw. analoge synthetische „Zuckerstrukturen“, deren Wirkmechanismus den physiologischen antithrombotischen Prinzipien entspricht. Dabei lassen sich natürliche und synthetische GA unterscheiden. Zu den natürlichen GA gehören das unfraktionierte Heparin (UFH), das niedermolekulare Heparin (NMH) und Danaparoid. Fondaparinux, Idraparinux und das Heparinmimetikum SR123781A gehören zu den synthetischen GA (Pöttsch et al., 2010).

1.5.1.1 Unfraktioniertes Heparin

Genuines Heparin kommt in allen Vertebraten vor, wobei sich die bedeutendsten Konzentrationen vor allem in der Darmmukosa, Lunge, Leber, Milz, dem Thymus und Herz finden, wo es in Mastzellen synthetisiert wird (Pöttsch et al., 2010). Heparin ist im Körper nicht an der Aufrechterhaltung des Blutflusses beteiligt, obwohl es unter den Glykosaminoglykan-GA (GAG) am stärksten gerinnungshemmend wirkt (Rabenstein, 2002). Es wird vermutet, dass es für die adäquate Speicherung der Granulasubstanzen verantwortlich ist (Humphries et al., 1999).

Seit der BSE-Krise wird UFH nur noch aus Schweinedarmmukosa isoliert, um jegliches Kontaminationsrisiko mit TSE-Erregern („transmissible spongiform encephalopathies“) zu vermeiden (Pöttsch et al., 2010).

UFH ist ein polydisperses Gemisch heterogener GAG-Moleküle mit einer relativen Molekülmasse (M_r) zwischen 5.000 und 30.000, wobei die mittlere M_r bei etwa 13.000

liegt. Da die verschiedenen UFH-Präparationen je nach Ausgangsmaterial und Herstellungsweise in ihren pharmakologischen Eigenschaften differieren, werden sie nach ihrem In-vitro-Wirkwert, im Falle von UFH beispielsweise durch eine Verlängerung der aPTT-Zeit (aktivierte partielle Thromboplastinzeit), quantifiziert (Pötzsch et al., 2010). Liquemin subcutan steht beispielsweise als Fertigspritze mit 5.000 IE zur Verfügung. UFH binden und aktivieren AT III, setzen TFPI frei und inhibieren FXa, FIIa und Thrombozyten (Schleiffenbaum et al., 2010).

1.5.1.2 Niedermolekulare Heparine

Niedermolekulare Heparine (NMH) wie Enoxaparin-Natrium (Clexane[®]) oder Nadroparin-Kalzium (Fraxiparin[®]) werden durch partielle Depolymerisation aus UFH hergestellt und zeigen im Gegensatz zu diesen ein deutlich vermindertes Blutungsrisiko, da sie keine Thrombozyteninhibition und kaum FIIa-Inhibition aufweisen. Laut Europäischem Arzneibuch (PhEur 6.0) liegt die mittlere M_r bei <8.000 (Pötzsch et al., 2010). Aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße wird die FIIa-Aktivität durch NMH-aktiviertes AT im Vergleich zu FXa nur untergeordnet beeinflusst.

Da die NMH wie die UFH biogene Arzneistoffe sind und somit auch Chargenvariabilitäten unterliegen, werden sie ebenfalls nach ihrem In-vitro-Wirkwert quantifiziert, wobei wegen ihrer relativ schwachen antikoagulatorischen in-vitro Effekte die aXa-Aktivität (aXa-IE/mg) als Wirkwert ermittelt wird (Pötzsch et al., 2010).

1.5.1.3 Danaparoid-Natrium (Orgaran[®])

Danaparoid ist eine Mischung aus partiell depolymerisierten GAG, die aus Schweinedarmmukosa gewonnen wird. Es besteht zu ca. 84 % aus niedermolekularem Heparansulfat, wobei ca. 4 % eine hohe Affinität zu AT besitzen. Die mittlere M_r liegt im Bereich von 4.000 und 7.000 (Pötzsch et al., 2010).

Obwohl damit nur 4 % seiner Masse erfasst werden, wird Danaparoid wie auch die NMH anhand seiner aXa-Aktivität quantifiziert (Alban et al., 2007). Wie auch Clexane[®] und Fraxiparin[®] hemmt es nicht FIIa und Thrombozyten.

1.5.1.4 Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®])

Fondaparinux ist ein synthetisch hergestelltes, 8 Sulfatgruppen enthaltendes Pentasaccharid mit einer M_r von 1.728. Seine Struktur entspricht dem AT-bindenden Teil der Heparinmoleküle mit einer zusätzlichen Methylgruppe am reduzierten Ende zur Stabilisierung der α -Konfiguration und Verhinderung unspezifischer Reaktionen mit Plasmaproteinen. Fondaparinux ist damit der erste spezifisch wirkende Arzneistoff auf Basis eines strukturell definierten, synthetisch hergestellten Oligosaccharids (Pötzsch et al., 2010).

1.5.2 Rekombinantes APC (Xigris[®])

1.5.2.1 Wirkmechanismus

Die Beeinträchtigung des Protein C-Weges spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis. Die Gabe von humanem rekombinanten APC (rAPC) ist eine Möglichkeit, die Dysregulation der gerinnungshemmenden Mechanismen zu korrigieren und die Ausbreitung der Thrombingeneration und Bildung mikrovaskulärer Thrombosen zu verhindern (Levi et al., 2007).

Bei allen Patienten mit schwerer Sepsis kommt es zu einer überschießenden Aktivierung des inflammatorischen Systems mit nachweisbaren Ebenen an zirkulierenden inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, aktivierten Entzündungszellen und anderen Markern erhöhter inflammatorischer Aktivität. Nahezu alle septischen Patienten entwickeln zudem auch Auffälligkeiten in der Gerinnung, die von einer leichten Gerinnungsaktivierung bis hin zur fulminanten DIC reichen können (Levi et al., 2007).

Das APC-System ist bei Sepsispatienten auf nahezu allen Ebenen eingeschränkt. Die Plasmaspiegel des Zymogens PC sind durch die eingeschränkte Synthese, den Verbrauch und Abbau durch proteolytische Enzyme wie die neutrophile Elastase sehr niedrig (Eckle et al., 1991; Mesters et al., 2000; Vary et al., 1992). Durch eine Herabregulation von Thrombomodulin durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 kommt es zudem zu einer verminderten PC-Aktivierung (Faust et al., 2001; Nawroth et al., 1986). Die niedrigen Protein S Spiegel schränken die Funktion des

Protein C-Systems zusätzlich ein. Durch die akute-Phase-Reaktion bei entzündlichen Erkrankungen kommt es zu erhöhten Plasmaspiegeln von C4BP und somit zu einem relativen Protein S-Mangel. Weiterhin kommt es auch zu einer Herabregulation von EPCR, was wiederum das PC-System beeinträchtigt (Taylor et al., 2000).

Die Verabreichung von APC in einem Pavianmodell mit intravenöser E. coli-Gabe führte zu einem Überleben aller Tiere, während alle Tiere der Kontrollgruppe starben (Taylor et al., 1987). Ein ähnlicher Effekt konnte bei Kaninchen mit Meningokokken-bedingtem Endotoxinschock beobachtet werden. In einem Rattenmodell des septischen Schocks verhinderte die Gabe von APC die TNF- α vermittelte Hypotension, vermutlich durch die Modulation der NO-Rückmeldung (Isobe et al., 2001).

Bei Patienten mit schwerer Sepsis führte die Gabe von rAPC zu einer erheblichen Verbesserung der mikrozirkulatorischen Perfusion (De Backer et al., 2006). Weiterhin beeinflusst APC möglicherweise durch Hemmung des PAI-1 die Fibrinolyse. In einem Ratten-Modell der DIC konnte eine Blockade des PAI-1 durch APC nachgewiesen werden, weitere Experimente zeigten die Fähigkeit von APC, die Gerinnung in vivo zu verbessern (Aoki et al., 2000).

Definitive Beweise für den vorteilhaften Effekt von rAPC bei schwerer Sepsis ergeben sich initial aus klinischen Studien (Bernard et al., 2001 (a), Bernard et al., 2001 (b)).

1.5.2.2 Studienbeschreibung

Drotrecogin alfa (Drotrecogin α , DrotAA) ist die erste Verbindung, die nachweislich die Überlebenschance bei Patienten mit schwerer Sepsis verbessert. Der Mechanismus, der dieser Verbesserung zu Grunde liegt ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es konnte jedoch anhand von Studien gezeigt werden, dass DrotAA einen gerinnungshemmenden Effekt durch die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa (Marlar et al., 1981), einen antiinflammatorischen (Esmon, 2000), einen fibrinolytischen (Macias et al., 2005), sowie einen antiapoptotischen (Mosnier et al., 2003) und zytoprotektiven (Mosnier et al., 2007) Effekt ausübt. Von diesen Wirkungen stellt die gerinnungshemmende Eigenschaft die einzige bekannte Nebenwirkung dar, nämlich das erhöhte Blutungsrisiko (Fumagalli et al., 2007).

Drotrecogin α (Xigris[®]) ist eine rekombinante Form des APC und wurde 2001 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis und hoher Mortalität zugelassen. 2002 wurde der Gebrauch von der Europäischen Arzneimittelagentur auf die Behandlung von Patienten mit zwei oder mehr Sepsis-induzierten Organdysfunktionen eingeschränkt.

Zusammen mit diesen Empfehlungen wurden andere Studien von der FDA mandatiert, um die von PROWESS (Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) aufgestellte Hypothese, Patienten mit einem geringen Sterberisiko könnten durch die Gabe von Xigris geschädigt und der durch Xigris hervorgerufene Überlebensvorteil durch die prophylaktische Gabe von Heparin reduziert werden, zu überprüfen (Laterre, 2007).

In einer Phase II und III Studie konnte gezeigt werden, dass mit einer kontinuierlichen DrotAA Infusion (24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) bei Patienten mit schwerer Sepsis die D-Dimere und IL-6 Level, sowie die Gesamtsterblichkeit im Vergleich zur Placebogruppe deutlich abfielen (Bernard et al., 2001; Laterre, 2007). In weiteren Studien zeigte sich, dass es unabhängig von Geschlecht, Alter, Infektionstyp, Art der Pathogenität, chirurgischem Status und biochemischen Maßnahmen zu einem Überlebensvorteil unter der Behandlung mit DrotAA kam (Ely et al., 2003; Laterre et al., 2005; Opal et al., 2003).

Diese Erkenntnisse führten zu der Entscheidung der FDA, DrotAA zur Behandlung von Sepsispatienten mit einem hohen Mortalitätsrisiko einzusetzen. Aufgrund der Tatsache, dass Patienten, welche gleichzeitig zur Behandlung mit DrotAA prophylaktisch Heparin bekamen, einen geringeren Überlebensvorteil hatten als Patienten ohne Heparinprophylaxe, wurde die Vermutung aufgestellt, dass Heparin mit DrotAA interagiert.

2007 befand die EMA (European Medicines Agency) jedoch, dass die in der PROWESS gefundene Wirksamkeit von DrotAA nicht reproduziert werden konnte, weshalb sie weitere klinische Daten forderte (Hackeng et al., 2006).

Eine Cochrane-Analyse ergab, dass in fünf weiteren klinischen, randomisierten Studien kein signifikanter Überlebensvorteil für die mit DrotAA behandelten Sepsispatienten gezeigt werden konnte (Ndonwi et al., 2008). Nachdem eine weitere Studie zur Behandlung des septischen Schocks (PROWESS-SHOCK-Studie) die Endpunkte

verfehlte, verkündete der Hersteller im Oktober 2011 die weltweite Verkaufseinstellung des Medikaments (Rossi et al., 2013).

1.6 Aptamere

1.6.1 Selektion von Aptameren

Aptamere sind kurze, einzelsträngige Nukleinsäuren (DNA oder RNA) und besitzen eine klar definierte dreidimensionale Faltung. Sie binden spezifisch an definierte Zielmoleküle und inhibieren dadurch potentiell deren biologische Funktionen (Mayer, 2009). Der Begriff Aptamer ist eine Wortchimäre aus dem lateinischen Wort „aptus“ (passend) und dem Griechischen Begriff „meros“ (Teil) (Ellington, 1990). Aptamere werden durch In-Vitro-Selektionstechniken, auf Basis des sogenannten SELEX-Verfahrens (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) gewonnen (Müller et al., 2009b) (siehe Abb. 3).

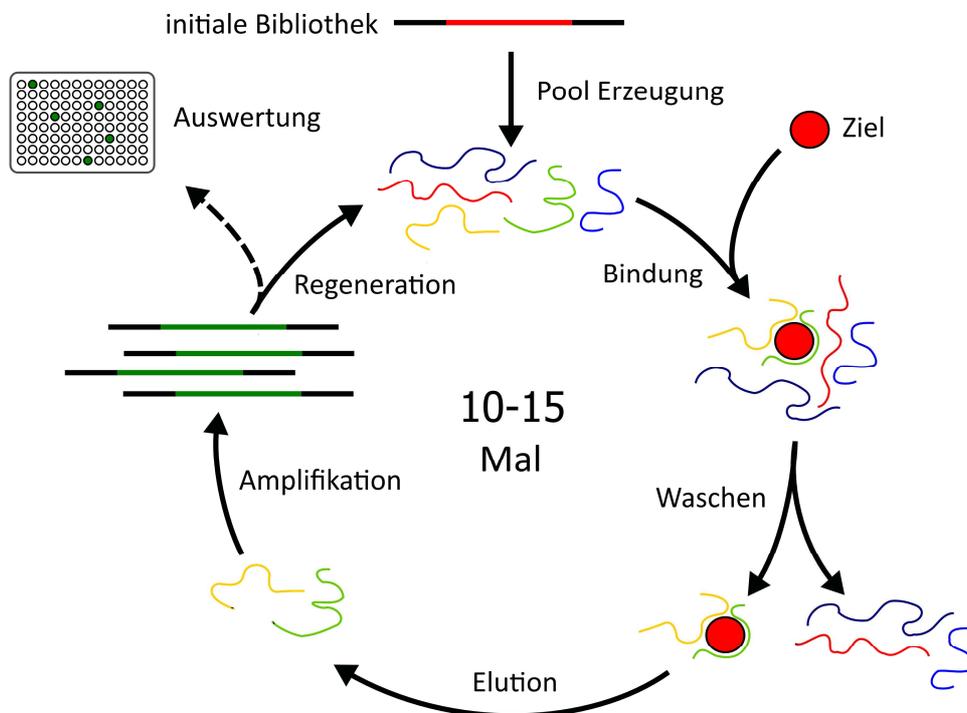


Abb. 3: Schematisch gezeigter Ablauf des SELEX-Prozesses (nach Schütze et al., 2011)

1.6.2 Diagnostische und therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren

Bringt man Aptamere durch Modifikation etwa an ihrer 5'-Position zum fluoreszieren, sind sie für den Einsatz als Fluoreszenzsonden geeignet (Mayer, 2009). Die Modifikation kann dabei chemisch enzymatisch oder durch eine Kombination aus beidem erfolgen (Seelig et al., 1999; Sengle et al., 2000). Durch eine PCR-Amplifikation mit passenden fluoreszierenden Primer-Molekülen und nachfolgender Einzelstrangverdrängung oder durch direkte chemische Synthese können DNA-Aptamere verändert werden, sodass gewünschte fluoreszierende Moleküle oder ein anderer Rest eingeführt werden kann (Mayer, 2009). In Kombination mit anderen funktionellen Nukleinsäureuntereinheiten können solche Reporteraptamere als hoch entwickelte Diagnosewerkzeuge verwendet werden (Mayer, 2009).

Modifizierte Aptamere werden ähnlich wie Antikörper in verschiedenen Analyseverfahren eingesetzt, um Biomoleküle mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren (Mayer, 2009). Diese Analyseverfahren sind beispielsweise ELISA-ähnliche Formate (Drolet et al., 1996; Ferreira et al., 2008), Western-Blot-Analyse (Murphy et al., 2003), Kapillarelektrophorese (Berezovski et al., 2005; Zhang et al., 2008), Durchflusszytometrie (Chang et al., 2008), In-vivo-Imaging (Charlton et al., 1997), HPLC (Müller et al., 2008; Michaud et al., 2003) und Mikro-Arrays (Bock et al., 2004; Brody et al., 1999).

Eine weitere Entwicklung im Bereich der Aptamerdiagnostik setzt auf Aptamere als spezifische Liganden und als Template für Amplifikationsreaktionen (Mayer, 2009).

Trotz der Erfolge wird aktuell ein auf Aptameren basierendes Detektionsverfahren im klinischen Alltag nicht eingesetzt, was daran liegen könnte, dass Aptamere, um ihre Zielmoleküle zu erkennen, eine intakte, korrekt gefaltete Zielstruktur benötigen (Mayer, 2009). Antikörper, welche bisher im klinischen Alltag verwendet werden, erkennen dagegen ein lineares Epitop des Zielproteins, was eine Detektion auch dann noch möglich macht, wenn das Protein teilweise oder vollständig denaturiert ist. Daher werden Aptamere sich vermutlich am besten bei der Detektion niedermolekularer Substanzen durchsetzen können, da in diesem Fall der Umgang mit der Zielstruktur weniger problematisch ist (Mayer, 2009). Andererseits ermöglicht die bevorzugte Erkennung intakter, mehr globulärer Strukturen die gezielte Detektion funktionell aktiver Zielproteine und erlaubt auch eine bessere Diskriminierung zwischen strukturell ähnlichen Molekülen, was beispielsweise eine sensitive Bestimmung von aktiven

Plasmaenzymen auch bei Vorliegen von wesentlich höher Konzentrationen der jeweiligen Zymogene erlaubt (Müller et al., 2007; Müller et al., 2012).

Aptamere mit definierter Struktur und Funktion können auch zu multifunktionellen Molekülen mit verschiedenen funktionellen Resten zusammengestellt werden. Somit können sie als Hilfsmittel für die Entwicklung von Transportmolekülen verwendet werden, welche spezifisch maligne Zellsubtypen erkennen (Mayer, 2009). Eines der am besten studierten Aptamere, das Aptamer A10, bindet beispielsweise das Prostata-spezifische Membranantigen, welches mit dem Ausbruch und Fortschreiten von Krebserkrankungen assoziiert ist (Lupold et al., 2002). Nach Modifizierung mit zusätzlichen Molekülen konnte eine selektive Aptamer-gesteuerte Freisetzung in Krebszellen beobachtet werden. So wurden zum Beispiel Nanopartikel mit verkapselten Chemotherapeutika (z.B. Docetaxel) an das modifizierte 5'-Aminoende des Aptamers gebunden (Cheng et al., 2007; Chu et al., 2006; McNamara et al., 2006), wodurch eine gezielte und effiziente Behandlung solider Tumoren möglich wird.

1.6.3 Aptamere gegen Gerinnungsfaktoren

Das erste beschriebene Aptamer, welches einen Gerinnungsfaktor bindet und inhibiert war das Thrombin-Aptamer HD1. Dieses 15 Basen lange DNA Oligonukleotid hemmt die prokoagulatorischen Funktionen von Thrombin, wie Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und die Thrombozytenaggregation (Bock et al., 1992). HD1 interagiert mit der Exosite 1 von Thrombin, die Liganden wie Fibrinogen, Faktor XI, Cofaktor V und VIII und Heparin-Cofaktor II bindet (Lane et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HD1 mit einer ähnlichen Affinität auch an Prothrombin bindet (Fredenburgh et al., 2006). Ein weiteres Thrombin-bindendes Aptamer (60.29), bindet an die Exosite II von Thrombin und wird heute als HD22 bezeichnet (Mayer et al., 2011). Die Exosite II bindet hauptsächlich Glykosaminoglykane wie Heparin, jedoch auch andere Liganden wie FV, FVIII und das Thrombozyten Glykoprotein Ib-alpha (Tasset et al., 1997).

Das Aptamer HD1-22 ist eine Verbindung dieser beiden Aptamere und ist derzeit der potenteste „aptamerische“ Thrombininhibitor (Mayer et al., 2011).

Ein Aptamer, das die A1 Domäne des vWF angreift, ist die DNA/RNA-Chimäre ARC1779. Obwohl Aptamere auf Nukleinsäurebasis nur minimale Immunreaktionen auslösen sollen, kam es unter der intravenösen Gabe von ARC1779 zu einer hypertensiven Reaktion. Die Konzentration und Häufigkeit der Applikation wurde erniedrigt, was zu einer guten Verträglichkeit führte (Mayer et al., 2011). Zusätzlich zu seinen Fähigkeiten als antithrombotisches Medikament verhindert ARC1779 den Desmopressin-induzierten Thrombozytenabfall bei Patienten mit der von Willebrand Erkrankung vom Typ 2b (Müller et al., 2012).

Die vorherrschenden Ziele der Aptamere sind zur Zeit Thrombin, welches auch ein Ziel des Aptamers NU172 ist, Faktor IXa (gebunden durch RB006 (REG-1)) und der von Willebrand Faktor, welcher Zielmolekül des Aptamers ARC1779 ist (Mayer et al., 2011).

1.6.4 Aptamere gegen APC

Die Selektion eines RNA-Aptamers gegen APC wurde bereits 1998 beschrieben (Gal et al., 1998). Das beschriebene Molekül inhibiert die Aktivität des aktiven Zentrums von APC. Eine Charakterisierung der Bindung an Protein C blieben die Autoren allerdings schuldig. Zudem kommt hinzu, dass es sich um ein unmodifiziertes RNA-Molekül handelte, welches durch RNasen in beispielsweise Vollblut oder Plasma schnell degradiert werden würde (Mayer, 2009). Um eine erfolgversprechendere Variante zur effektiven Inhibition aber auch für den quantitativen Nachweis von zirkulierendem APC zu erhalten, wurde ebenfalls ein DNA-basiertes Aptamer gegen APC selektiert und in 2009 publiziert (Müller et al., 2008; Müller et al., 2009a). Nachfolgend soll das entsprechende Selektionsverfahren und die Charakterisierung der gefundenen Moleküle kurz beleuchtet werden.

Vor der Selektion wurde APC biotinyliert und an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gebunden, welche dann während der In-Vitro-Selektion benutzt wurden (Müller et al., 2008). Als Nukleinsäurebibliothek wurde ein ssDNA-Pool mit einer zufälligen Region von 49 Nukleotiden gewählt (Raddatz et al., 2008). Nach 12 Selektionszyklen wurde die Bibliothek mittels Filter-Retentions-Analysen auf APC-Bindungen untersucht, wobei eine stark gesteigerte Affinität der Zyklen 10 und 12 der ssDNA Bibliothek im Vergleich zu der Anfangsbibliothek beobachtet werden konnte (Müller et al., 2008).

Klonierung und Sequenzierung der einzelnen Bestandteile des 10. Selektionszyklus ergab ein aus 14 Basen bestehendes Konsensmuster, 5'-TATCMCGNATGGGS-3' (Müller et al., 2009a). Aus allen untersuchten ssDNA-Molekülen zeigte HS02-88 die höchste Affinität mit $K_d = 0,43$ nM und wurde somit für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Von diesem Aptamer wurden einige verkürzte Varianten hergestellt, um die minimale Sequenz herauszufinden, welche für eine hohe Affinität nötig ist (Müller et al., 2009a). Dabei zeigte sich, dass ein aus nur 44 Nukleotiden bestehendes Molekül (HS02-44G) diese Voraussetzungen erfüllte (Müller et al., 2009b).

Alle Aptamere der HS02-Familie zeigten eine 200-fach höhere Affinität gegenüber APC im Vergleich zu Protein C. Auch konnte gegenüber strukturell verwandten Enzymen aus dem Gerinnungssystem keine Bindung der Aptamere beobachtet werden, was die hohe Spezifität dieser Aptamere widerspiegelt (Müller et al., 2009b).

1.7 Zielsetzung

Aktiviertes Protein C (APC), die aktive Serinprotease des Zymogens Protein C, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Blutgerinnung. Es wird nach Bindung an den Endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert und begrenzt durch Inaktivierung der prokoagulatorisch wirksamen Cofaktoren Va und VIIIa die Gerinnungsbildung. Darüber hinaus hat es zytoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften, die ebenfalls über die Bindung an EPCR sowie die Aktivierung von PAR-Rezeptoren vermittelt werden. Auf diesen Eigenschaften basierte der Einsatz von rekombinantem APC (Drotrecogin α , Xigris[®]) bei Patienten mit Sepsis. Da es unter der Therapie mit rekombinant hergestelltem APC (rAPC, Xigris[®]) zu vermehrten Blutungsereignissen mit letalem Ausgang kam, wurde die Zulassung für dieses Medikament im Oktober 2011 zurückgezogen.

Während die Aktivierung von Protein C gut erforscht ist, ist weniger über die Inaktivierungskinetik von APC bekannt, das hauptsächlich durch das Serpin Protein-C-Inhibitor (PCI) inhibiert wird. Eine Beschleunigung dieser Serpin-vermittelten Inaktivierungsreaktion in Anwesenheit von Heparin in Analogie zum Heparin-Antithrombin-

Mechanismus wird diskutiert und könnte zu einer Beeinträchtigung der Wirkung von Drotrecogin α bei Sepsispatienten führen, die häufig gleichzeitig mit Heparin behandelt wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Inaktivierungskinetik von APC in der Plasmamatrix. Hierzu sollen verschiedene Testverfahren entwickelt werden, die auf der Antikörper- oder Aptamer-vermittelten Immobilisierung von APC oder APC-PCI-Komplexen und deren anschließendem Nachweis durch Fluoreszenz-markierte Antikörper oder proteolytische Spaltung eines fluorogenen Substrates basieren. Die Testverfahren sollen eingesetzt werden, um den Einfluss verschiedener Plasmabestandteile und Wirkstoffe auf die Inaktivierungskinetik von APC zu untersuchen. Diese sollen neben Heparinen auch gegen APC gerichtete Aptamere umfassen, die zur Antagonisierung von APC und damit zur besseren Steuerung einer Therapie mit Drotrecogin α eingesetzt werden könnten.

2. Materialien

2.1 Verwendete Chemikalien

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl_2)

KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar

Natronlauge (NaOH) 1 mmol/l

Salzsäure (HCl) 1 mmol/l

Merck GmbH, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Magnesiumchlorid-Dihydrat (MgCl_2)

Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Natriumchlorid (NaCl)

Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

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

2.2 Verwendete Reagenzien

Affinity Biologicals INC., Canada

Goat anti-human Protein C Inhibitor (PCI), Peroxidase Conjugated IgG

Goat anti-human Protein C Inhibitor (PCI), Affinity-Purified IgG

AppliChem GmbH, Darmstadt

Streptavidin ultrapure

Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main

Enoxaparin-Natrium (Clexane[®])

Bayer AG, Leverkusen

Trasylol 0,5 (konzentrierte Aprotininlösung)

Bayer Health Care AG, Leverkusen

Hirudin (Refludan[®])

CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf

Human Protein S

Aktiviertes Protein C (plasmagereinigt)

Dako Denmark A/S

Goat anti Rabbit HRP

Rabbit anti Goat HRP

Rabbit anti Sheep HRP

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

Drotrecogin alpha (Xigris[®])

Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Aqua dest. (Ampuwa[®]), Wasser für Injektionszwecke

Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

Heparin-Natrium (Liquemin[®])

In- house Produktion

Poolplasma (gepooltes Citratplasma) von gesunden Blutspendern

Mitarbeiterpool (gepooltes Citratplasma von gesunden Mitarbeitern des Instituts)

Invitrogen, Karlsruhe

Dynabeads M-280 Streptavidin

Microsynth AG, Balgach (Schweiz)

HS02-44G 3'biotinyliert, ssDNA Aptamer

HS02 52G 3'biotinyliert, ssDNA Aptamer

HS02-88G 3'biotinyliert, ssDNA Aptamer

Pentapharm, Basel (Schweiz)

PefafLOUR PCa (Pefa-5791)

Pierce, Bonn

StartingBlock Blockpuffer

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Lyophilisiertes Humanplasma, frei von Protein S

BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)

Sanofi-Synthelabo GmbH, Berlin

Nadroparin-Calcium (Fraxiparin[®])

Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®])

Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Bovine Serum Albumin (BSA)

Rabbit anti-human Protein C

Sheep anti-human Protein C

Tween 20

DMSO

Roche, Mannheim

BM Chemiluminescence ELISA Substrat

Thiemann Arzneimittel GmbH, Waltrop

Orgaran

2.3 Verwendete Pufferlösungen**Coating-Buffer**

Doppelt destilliertes Wasser

30 mM Na₂CO₃

200 mM NaHCO₃

pH 9,0

10-fach PBS

Doppelt destilliertes Wasser

137 M NaCl

27 mM KCl

96 mM Na₂HPO₄

15 mM KH₂PO₄

pH 7,4

Streptavidin-Puffer

1-fach PBS

3 mM MgCl₂

0,1 % BSA

pH 7,4

PBS-Waschpuffer

Doppelt destilliertes Wasser

137 M NaCl

27 mM KCl

96 mM Na₂HPO₄

15 mM KH₂PO₄

3 mM MgCl₂

0,05 % Tween

pH 7,4

Aptamerpuffer

NaCl 0,9 %

10 mM TrisHCl

1 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

0,1 % BSA

TBS-Waschpuffer

NaCl 0,9 %

10 mM TrisHCl

1 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

0,05 % Tween

Substratpuffer

NaCl 0,9 %

10 mM TrisHCl

4 mM CaCl₂

pH 8,5

Verdünnungspuffer

0,1 % BSA

In PBS-Waschpuffer

2.3 Verwendete Materialien

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Einweg- Pasteurpipetten (3 ml)

Eppendorf GmbH, Hamburg

Eppendorfcups (1,5 und 2 ml)

Nunc GmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden

Flouronunc 96- well Mikrotiterplatte (weiß), flacher Boden

2.4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall

Plattenfluorometer FLX 800

Cenco Instrumenten B.V., Breda (Niederlande)

Vortex- Gerät

Eppendorf GmbH, Hamburg

Tischzentrifuge 5804

Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgweder

Wasserbad GLF (37 °C)

Gilson, Ohio, USA

Kolbenhubpipetten (P 10, P 20, P 200, P 1000, P 5000)

Greiner Bio- One

Tubes (15 ml, 50 ml)

Metrohm Deutsche GmbH & Co, Filderstadt

pH-Meter 744

Mettler- Toledo GmbH, Gießen

Digitalwaage, Modell PL1200

NunGmbH & CO KG Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden

Plattenfluorometer FluroScan

SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Dreieich

Tecan SLT-Washer für Mikrotiterplatten

Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich

Platten- Fluoro / Luminometer Fluoroscant Ascent

3. Methoden

3.1 Allgemeine Versuchsprinzipien

3.1.1 Einleitung

Für die nachfolgenden Experimente wurden vier verschiedene Testmethoden verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Enzyme-Capture-Assay, einen APC-PCI-Komplex-ELISA und einen Captured-Enzyme-Assay, mit welchem sich sowohl die HWZ von APC als auch seine Komplexbildung mit PCI darstellen lässt.

3.1.2 Enzyme-Capture-Assay

Der Enzyme-Capture-Assay gehört in die Kategorie der Immuno Assay Verfahren und ist eine Variante des ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Zwar arbeiten alle ELISA-Derivate grundlegend mit den gleichen Prinzipien, es lässt sich jedoch ein direktes von einem indirekten Verfahren differenzieren.

Bei dem direkten ELISA wird das Analysat direkt mit der Probenmatrix auf die Mikrotitrationsplatte gegeben, ohne dass ein Antikörper vorher an diese gebunden wurde. Es kommt zu einer unspezifischen Bindung von Probenmatrix und Analysat an die Platte. Anschließend wird mit einem spezifischen, hoch affinen Liganden inkubiert, bei dem es sich beispielsweise um Aptamere oder Antikörper handeln kann. Dieser Ligand bindet nun an das Analysat, der Überschuss wird nach Inkubation durch einen Waschvorgang von der Platte entfernt. Ein Nachweis gebundener Liganden erfolgt durch eine Enzymreaktion, entweder durch direkte Markierung des Primär-Liganden, oder aber durch Anwendung eines zweiten, gegen den Primär-Liganden gerichteten, Enzym-markierten Liganden. Das so eingebrachte Enzym setzt abschließend ein entsprechendes Substrat um, das, je nach Art des Substrats, über photometrische oder fluorometrische Messungen quantifiziert werden kann. Hierbei steht der Substratumsatz in einem direkten Verhältnis zu der in der Probe befindlichen Konzentration des zu erfassenden Analyten.

Bei dem indirekten ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden (Abb. 4). Der erste Antikörper (Catcher) wird an die

Platte gebunden und kann nun das nachzuweisende Antigen binden. Eine unspezifische Bindung von Stoffen aus der Probenmatrix wird durch eine vorherige Inkubation der Platte etwa mit Bovinem Serum Albumin (BSA) verhindert. Die Probenmatrix mit dem nachzuweisenden Analysat wird nun auf die Platte gegeben. Nach Inkubation werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt, zurück bleibt nur das durch den Antikörper gebundene Analysat. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper zur Detektion hinzugegeben, welcher ein anderes Epitop erkennt als der Catcher. An diesen zweiten Antikörper ist, wie vorstehend beschrieben, außerdem ein Enzym gebunden. Auch ein weiterer, enzym-markierter Antikörper kann hierzu eingesetzt werden.

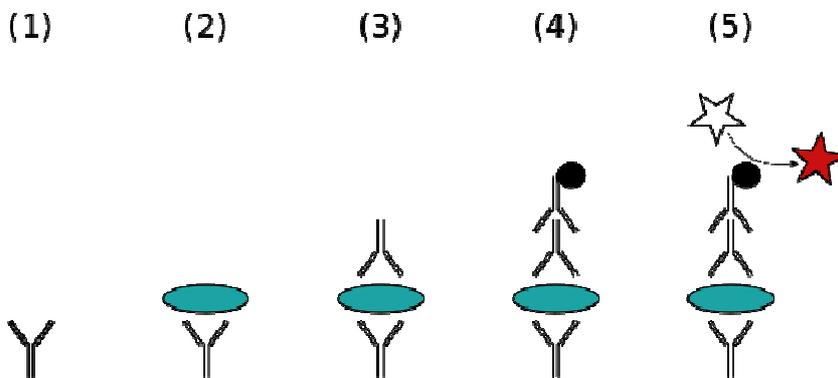


Abb. 4: Beispielhafter Ablauf eines indirekten Sandwich Assays. (1) Der Catcher ist an den Boden der Platte (nicht dargestellt) gebunden. (2) Der Analysat bindet an den Antikörper. (3) Ein zweiter Antikörper bindet an den Analysaten. (4) Ein mit einem Enzym konjugierter Antikörper bindet an den zweiten Antikörper. (5) Das an den Antikörper gebundene Enzym setzt ein Substrat um. Die Menge an umgesetztem Substrat ist proportional der Menge des Analysaten.

Der hier verwendete Enzyme-Capture-Assay ist ein indirektes Verfahren, die Rolle des Catchers übernimmt in diesem Fall das ssDNA Aptamer HS02-52G (Abb. 5).

Bei dem Analysat handelt es sich um ein Enzym, sodass der Nachweis hier direkt mittels eines fluorogenen Substrates erfolgen kann. Das verwendete Peptidsubstrat PefafLOUR Pca (Pefa-5791) besteht aus einer Aminosäurekette und dem Farbstoff AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin; siehe Abb. 6):

Pyrimidin-Prolin-Arginin-AMC-Acetat. Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt $K_M = 0,56$ mM, pro Sekunde werden 62,0 Moleküle umgesetzt (Kcat).

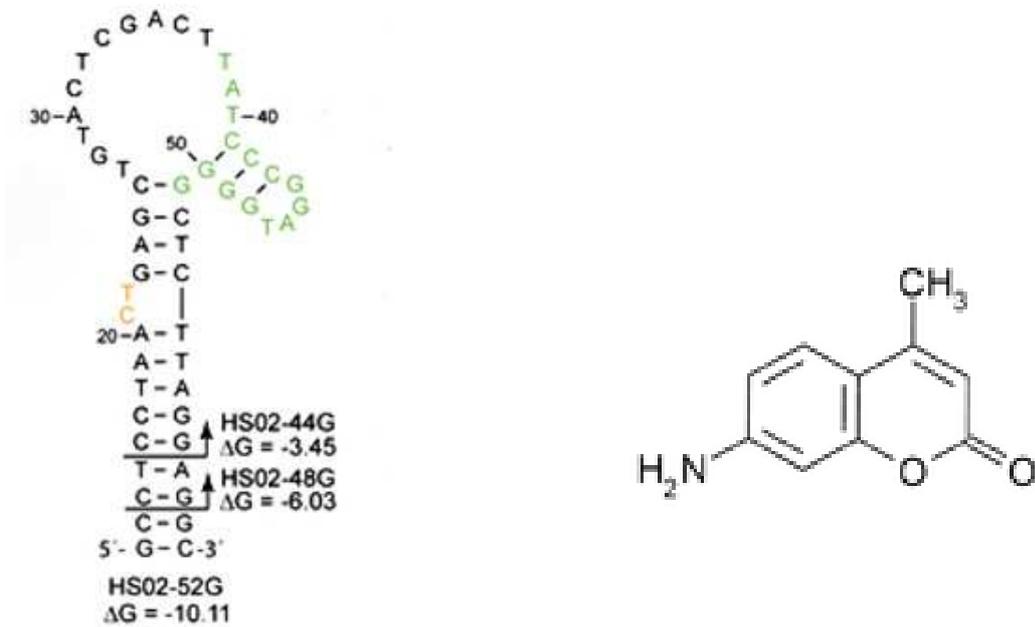


Abb. 5: Sekundäre Struktur des Aptamers HS02-52G und seine Stabilität (ΔG [kcal/mol])
 Abb. 6: chemische Struktur von 7-Amino-4-Methylcoumarin.

Durch die proteolytische Spaltung des Substrates mittels APC wird der Indikator freigesetzt und kann fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 360$ nm sowie einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 460$ nm gemessen werden (siehe Abb. 7). Die Fluoreszenzemission je Zeiteinheit ist bei Vorliegen eines deutlichen Substratüberschusses proportional zur vorhandenen Menge an Enzymen.

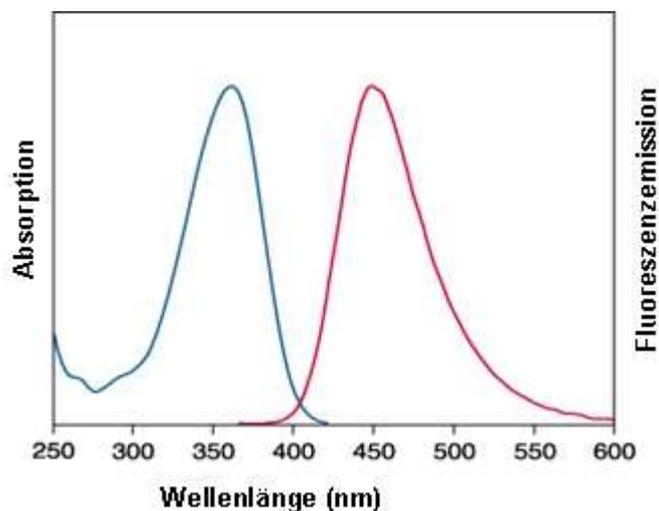


Abb. 7: Absorptions- und Emissionsspektrum von AMC.

3.1.3 APC-PCI-Komplex-ELISA

APC-PCI-Komplexe entstehen, wenn APC einen kovalenten Komplex mit PCI bildet, was zu einer Inaktivierung aller enzymatischen Funktionen von APC führt. Die pathophysiologische Bedeutung des PCI ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Aortenaneurysmata und Artherosklerose die APC-PCI-Komplexe erhöht waren und einen Prognosefaktor für ein schlechteres Outcome darstellen (Tasset et al., 1997).

Beim APC-PCI-Komplex-ELISA handelt es sich ebenfalls um einen Sandwich Assay (siehe Abb. 4). Mit einem an die Platte fixierten Antikörper werden die Komplexe gefangen. Ein zweiter Antikörper bindet an ein anderes Epitop der Komplexe und kann durch einen dritten, mit Peroxidase versehenen Antikörper nachgewiesen werden. Wird der Peroxidase Wasserstoff als Substrat angeboten, oxidieren die freiwerdenden Protonen das vorher farblose Chromogen unter Bildung von Wasser zu einem farbigen Endprodukt. Das in diesem Fall verwendete Luminol reagiert unter Bildung von Chemolumineszenz, welche wiederum mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann.

3.1.4 Captured-Enzyme-Assay

Der Captured-Enzyme-Assay stellt ein anderes Messprinzip zum Nachweis der APC-Halbwertszeit und seiner Komplexbildung mit PCI dar. Im Prinzip handelt es sich auch hier wieder um indirektes ELISA-Verfahren. Der Unterschied liegt darin, dass der Analysat nicht aus der Probenmatrix an den ersten Antikörper bindet, sondern in definierter Konzentration in einem einzelnen Schritt an den Catcher gebunden wird. Anschließend wird die Probenmatrix (Plasma) auf die Platte gegeben. In der Probenmatrix vorhandenes Protein C hat somit nicht die Möglichkeit, Antikörper zu besetzen, welche vorher schon mit APC beladen wurden. Der im Plasma enthaltene PCI bindet währenddessen an das APC.

Nach festgelegten Zeiten werden die Wells dann manuell gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Hiefür wurde das Plasma mit einer 8-Kanal Pipette aus den Vertiefungen gesaugt und 200 µl Waschpuffer hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt, wobei jeweils neue Pipettenspitzen verwendet wurden, um eine

Kontamination zu vermeiden. Nach Abschluss der Messzeiten wird die Platte noch dreimal maschinell gewaschen. Dabei wird jeder Streifen der Platte abgesaugt und 300µl Waschpuffer zugegeben, wobei die Platte im letzten Durchlauf nur abgesaugt wird. Anschließend wird das Peptidsubstrat Pefluor hinzugegeben. Die Messung erfolgt wie oben beschrieben.

Anders als bei den anderen beiden Testverfahren können hier anschließend auch direkt die Komplexbildungen gemessen werden. Das Peptidsubstrat wird maschinell abgewaschen und ein nächster Antikörper hinzugefügt, welcher die gebildeten APC-PCI-Komplexe an einer anderen Stelle bindet als der Catcher. Nach Inkubation und erneutem Waschen erfolgt die Zugabe eines mit Horseradish Peroxidase (HRP)-markierten Sekundärantikörpers, welcher an den vorherigen bindet und wiederum durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates gemessen werden kann.

Dieses Testverfahren eignet sich besonders gut zur Beurteilung des Einflusses von Aptameren auf die Halbwertszeit des Enzyms. Da in dem Enzyme-Capture-Assay das Aptamer bereits an der Platte immobilisiert ist und als Catcher für das APC dient, ist die APC-Bindungsstelle für das Aptamer schon besetzt. Dahingegen wird beim Captured-Enzyme-Assay ein Antikörper als Catcher für das APC verwendet, sodass die Bindungsstelle für das Aptamer unbesetzt bleibt.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Enzyme-Capture-Assay

3.2.1.1 Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten

Zum Beschichten der verwendeten Platten wurden pro Well 100 µl einer 10 µg/ml-Lösung von biotinyliertem BSA in Coating Buffer auf die Platten gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert, wobei die Platten wie auch bei allen nachfolgend beschriebenen Inkubationen durch eine Klebefolie versiegelt wurden. Der pH-Wert von 9,0 des verwendeten Coating Buffers sorgte für eine optimale Bindung

des BSA an die Mikrotitrationsplatten. Nach Inkubation wurde die Platte dreimalig mit einem automatischen Wascher gewaschen. In jedem Zyklus wurden 300 µl Waschpuffer in die Wells gegeben und anschließend abgesaut.

Anschließend wurde 10 µg/ml Streptavidin in Streptavidin-Puffer angesetzt und 100 µl der Lösung in die Wells pipettiert. Während der einstündigen Inkubation bei RT bindet Streptavidin nun einerseits an dafür vorgesehene Bindungsstellen des BSA-Biotins, andererseits fungiert es als Bindungspartner für die als Catcher dienenden Aptamere. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden nach erneutem dreimaligen Waschen und Absaugen der Platte die noch freien Bindungsstellen durch Zugabe von Blockpuffer geblockt. Dieser wurde nach zweistündiger Inkubation bei RT von der Platte abgesaugt, welche nun benutzt oder bis zu einer späteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden konnten.

3.2.1.2 Auftragen des Aptamers

Das Aptamer HS02 52G 3'Bio wurde als Lyophilisat geliefert, in doppelt destilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Durch Zugabe von Aptamerpuffer wurde es auf die benötigte Konzentration von 5nM verdünnt. Das im Puffer enthaltene MgCl₂ soll hierbei die Struktur des Aptamers stabilisieren. Jeweils 100 µl der entstandenen Lösung wurden in die Wells der vorbeschichteten Platten pipettiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Dunkeln bei RT.

3.2.1.3 Auftragen der Proben und Standardkurve

Um die Halbwertszeit von APC messen zu können, wurde rAPC, bzw. pAPC zu normalem Poolplasma in ein Eppendorf Cup gegeben und dieses anschließend sofort verschlossen und gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung des APC im Plasma zu gewährleisten. Die Inkubation des mit APC gespickten Plasmas erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, um physiologische Bedingungen herzustellen. Nach 0, 5, 10, 20, 40, 60 und 120 Minuten wurde die im Plasma stattfindende Inaktivierung des APC durch PCI gestoppt, indem ein Teil des Pools 1:20 in eine Stopplösung pipettiert wurde. Diese bestand aus Aptamerpuffer, welcher mit 22 µM Aprotinin, 22 µg/ml Hirudin und 8,25 mM CaCl₂ versetzt war, da gezeigt werden konnte, dass die Bindung von HS02-52G an APC in Anwesenheit von Kalziumionen verbessert wird (Müller et al., 2009a).

Aprotinin (Trasylo[®] 0,5) ist ein aus 58 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Es wird aus Rinderlungen gewonnen und ist ein natürlicher Proteaseinhibitor, welcher Trypsin, Plasmin sowie Plasma- und Gewebe-Kallikrein und vor allem auch die Bindung von PCI an APC durch Bildung reversibler stöchiometrischer Enzym-Inhibitor-Komplexe hemmt. Dadurch konnte eine weitere Inaktivierung des APC durch PCI verhindert werden. Das ebenfalls verwendete Hirudin ist ein Gemisch chemisch sehr ähnlicher Polypeptide, welche aus 65-66 Aminosäuren bestehen. Es bindet an die Fibrinogenbindestelle des Thrombins (Exosite I) und hemmt über einen Ausläufer ebenso dessen aktives Zentrum. Somit konnte sichergestellt werden, dass keine Gerinnung des rekalkifizierten Plasmas oder eine nachträgliche Protein C-Aktivierung in den Plasmaproben stattfand, welche falsch hohe Messergebnisse der APC-Spiegel zur Folge gehabt hätte. Das jeweilige Eppendorf Cup wurde sofort nach Zugabe des Pools gemischt und auf Eis gestellt, um eine ausreichende Stabilität des APC zu gewährleisten.

Standardkurven mit einer $\frac{1}{2}$ -log₁₀ Konzentrationsspanne von 0 bis 10 ng mL⁻¹ rAPC (0-182 pmol L⁻¹) oder pAPC (0-178 pmol L⁻¹) wurden in entsprechenden Probenmatrizen vorbereitet. Das für die Standardkurven verwendete Poolplasma wurde 1:20 in Aptamerpuffer verdünnt, um die gleiche Matrix wie in den Proben herzustellen. Auch der zur Herstellung der Standardkurven verwendete Aptamerpuffer wurde mit final 20 µM Aprotinin, 20 µg/ml Hirudin und 7,5 mM Kalzium gespickt.

Je 100 µl der Proben, bzw. der Standardverdünnungen wurden in die Wells gegeben, mit einer Schutzfolie beklebt und für 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die Platte anschließend einmal per Hand gewaschen. Dafür wurden wie oben beschrieben die Wells mit einer 8-Kanal Pipette abgesaugt und anschließend 200 µl Waschpuffer pro Well mit der 8-Kanal Pipette hinzugegeben. Bei jeder Spalte wurden dabei neue Spitzen verwendet. Anschließend wurde die gesamte Platte dreimalig automatisch gewaschen.

3.2.1.4 Auftragen des fluorogenen Substrates

Das als Lyophilisat gelieferte Substrat (Pefalour PCa (Pefa-5791)) wurde in DMSO zu einer Konzentration von 10 mM gelöst und in Glasröhrchen aliquotiert, welche bei -20 °C gelagert wurden.

Vor dem Auftragen wurde das Substrat bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Durch Verdünnung mit Substratpuffer wurde es auf die gewünschte Konzentration von 300 µM gebracht und je 100 µl der Lösung in die Wells der Mikrotitrationsplatte pipettiert.

3.2.1.5 Messung der generierten Fluoreszenz

Nach dem Auftragen des Substrates wurde die Platte sofort im Fluorometer gemessen. Die gemessenen Werte wurden von dem angeschlossenen Computer aufgezeichnet. Bei der hier gewählten Einstellung handelt es sich um eine Endpunktmessung, welche bei RT erfolgte. Dabei wurde die Platte das erste Mal sofort nach Auftragen des Substrates gemessen, anschließend mit einer Klebefolie versiegelt und nach vierstündiger Inkubation bei RT im Dunkeln ein zweites Mal gemessen. Der Messwert 1 wurde vom Messwert 2 abgezogen und so die von APC generierte Fluoreszenz ermittelt.

Bei der Messung wurden Kalibratoren mit bekannter Konzentration mitgeführt. Aus den gemessenen Fluoreszenzen dieser Kalibratoren wurde durch Interpolation mittels einer 4-Parameter-Logistik-Funktion eine Standardkurve errechnet. Auf Basis der Standardkurve konnte aus den Fluoreszenzen der gemessenen Proben die Konzentration des APC errechnet werden. Diese Datenpunkte wurden mittels einer exponentiellen Zerfallsfunktion interpoliert und der Wert für die Zeit (X-Achse) bei 50 % der ursprünglichen Konzentration (Y-Achse) als Halbwertszeit errechnet.

Der Arbeitsbereich des Tests betrug dabei 0 bis 10 ng/ml.

3.2.2 APC-PCI-Komplex-ELISA

Um gebildete APC-PCI-Komplexe nachweisen zu können, wurde eine Mikrotitrationsplatte mit einem aufgereinigten anti-PCI-Antikörper beschichtet (Goat anti-human Protein C Inhibitor (PCI)). Der Antikörper wurde dazu in Coating-Buffer zu 1,25 µg/ml verdünnt und jeweils 100 µl der Lösung in die Wells pipettiert. Die Platte wurde

über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend 3 Mal automatisch gewaschen. Wie oben beschrieben wurde die Platte zur Verhinderung unspezifischer Bindungen mit Blockpuffer geblockt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach Absaugen des Blockpuffers wurden jeweils 100 µl derselben Proben aufgetragen, die auch für den Enzyme-Capture-Assay verwendet wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, als es eine neue Probenherstellung geliefert hätte.

Nach einstündiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die überschüssige Probenmatrix automatisch abgewaschen und der nächste Antikörper hinzugefügt. Hierbei handelte es sich um den Rabbit anti-human Protein C-Antikörper, welcher in Verdünnungspuffer auf eine finale Konzentration von 5,5 µg/ml gebracht wurde. Nach Zugabe von jeweils 100 µl der hergestellten Lösung in die Wells wurde die Platte erneut 1 Stunde bei RT inkubiert und danach maschinell gewaschen.

Der anschließend verwendete Sekundärantikörper (Goat anti Rabbit HRP) wurde in Verdünnungspuffer zu 0,156 mg/ml verdünnt und jeweils 100 µl der Lösung in die Wells pipettiert. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Platte automatisch gewaschen und je 100 µl der Substratlösung hinzugegeben. Die an den Antikörper gebundene Horseradish-Peroxidase (HRP) katalysiert dabei über mehrere Zwischenprodukte die Oxidation des als Substrat verwendeten Luminols zu 3-Aminophthalat. Die Reaktion wird von einer Lichtemission begleitet, welche via eines Plattenluminometers direkt gemessen wurde.

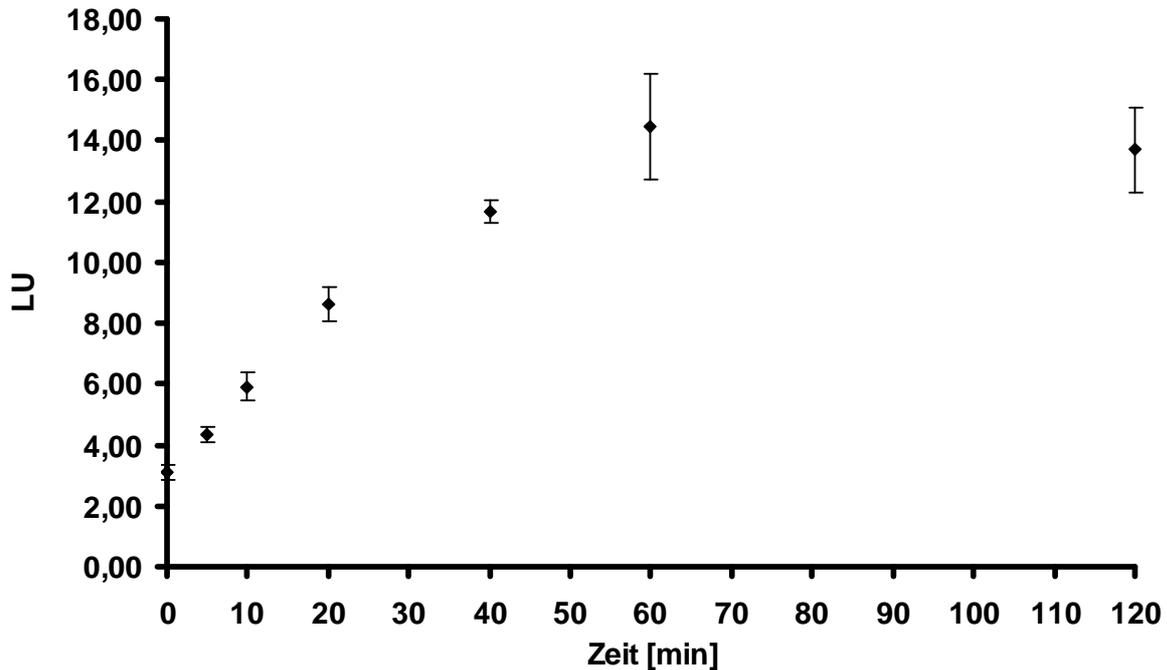


Abb. 8: Beispielhafter Aufbau der APC-PCI-Komplexe über eine Zeit von 120 min unter Verwendung von rAPC. Gemessen mittels APC-PCI-Komplex-ELISA (siehe auch Abb. 11).

3.2.3 Captured-Enzyme-Assay

3.2.3.1 Vorbereitung der Platte

Um das APC im ersten Versuchsteil einzufangen, wurde eine Mikrotiterplatte mit einem PC-Antikörper (Rabbit anti-human Protein C) beschichtet. Hierfür wurde der Antikörper in Coating-Buffer verdünnt und jeweils 100 μ l der Lösung in die Wells pipettiert, welche final 21 μ g/ml des Antikörpers enthielt. Wie oben beschrieben wurde die Platte über Nacht bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert, automatisch gewaschen und geblockt. Nach Absaugen des Blockpuffers wurden die entsprechenden Wells mit je 100 ng/ml pAPC oder rAPC beladen, welche in Aptamerpuffer auf die entsprechende Konzentration gebracht wurden. Die Platte wurde für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend maschinell gewaschen.

3.2.3.2 Auftragen der Proben

Als Probenmatrix wurde ein im Haus hergestellter Plasmapool verwendet. Von diesem wurden je 100 µl in die Wells gegeben und zu den auch vorher verwendeten Zeitpunkten (nach 0, 5, 10, 20, 40, 60 und 120 Minuten) manuell abgewaschen, um die Komplexbildung von APC und PCI zu stoppen. In der ersten Reihe befand sich dabei als Leerwert Aptamerpuffer. Zum Stoppen der Reaktion wurde zuerst mit einer 8-Kanal Pipette das Plasma abgesaugt und die Wells mit jeweils 100 µl Waschpuffer wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang des Absaugens und Auffüllens mit Waschpuffer wurde noch zwei Mal wiederholt, um wirklich alle Probenbestandteile entfernt zu haben, wobei die Wells zuletzt mit je 100 µl Aptamer-Puffer aufgefüllt wurden. Für jeden dieser Vorgänge wurden zur Vermeidung von Kontaminationen neue Pipettenspitzen verwendet.

Nach Abschluss der 120 Minuten wurde die gesamte Platte noch 3 Mal automatisch gewaschen.

3.2.3.3 Auftragen des flourogenen Substrates und Messung der Fluoreszenz

Das Auftragen des Substrates sowie die anschließende Messung der Fluoreszenz mit Hilfe des Plattenfluorometers erfolgte wie oben für den Enzyme-Capture-Assay beschrieben.

3.2.3.4 Nachweis der APC-PCI-Komplexe

Nach Abschluss der zweiten Messung wurde die Platte maschinell gewaschen und der PCI-Antikörper hinzugegeben. Dieser wurde in Verdünnungspuffer verdünnt und je 100 µl der Lösung in die Wells pipettiert, wobei die finale Konzentration des Antikörpers 2,5 µg/ml betrug. Die Platte wurde eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert und maschinell gewaschen. Es folgte das Auftragen des HRP-markierten Sekundärantikörpers (Rabbit anti Goat HRP), welcher mit Hilfe des Verdünnungspuffers auf eine Konzentration von 0,325 µg/ml gebracht wurde. Wieder wurde die Platte 1 Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend automatisch gewaschen. Das Auftragen des Substrates sowie die anschließende Messung erfolgte wie vorstehend für den APC-PCI-Komplex-ELISA beschrieben.

3.3 Vorversuche zur Testetablierung

3.3.1 Herstellung der Proben

Ziel war es, die Herstellung der Proben für den Enzyme-Capture-Assay und den APC-PCI-Komplex-ELISA so zu optimieren, dass einerseits möglichst wenig Material verbraucht und andererseits annähernd physiologische Bedingungen hergestellt wurden. Um den Testablauf des Enzyme-Capture-Assay zu überprüfen wurden die ersten Proben zur Einfachheit der Handhabung unverdünnt und bei Raumtemperatur hergestellt. Dafür wurde mit rAPC gespicktes Poolplasma in Eppendorf Cups vorgelegt und die APC-PCI-Komplexbildung zu den vorgegebenen Zeiten gestoppt, indem mit Aprotinin und Hirudin versehener Aptamer-Puffer in den Pool pipettiert und das Eppendorf Cup anschließend gevortext wurde. Bei dieser Art der Probenherstellung wurde verhältnismäßig viel rAPC verwendet, sodass versucht wurde, den Herstellungsablauf so zu verändern, dass die benötigte Menge an rAPC herunterreguliert werden konnte. Dafür wurde das mit rAPC versehene Plasma 1:10, bzw. 1:20 in die „Stopplösung“, bestehend aus Aptamer-Puffer, Aprotinin, Hirudin und Kalzium pipettiert. Die Eppendorf Cups wurden anschließend wieder gevortext. Die Herstellung wurde zudem einmal bei Raumtemperatur und einmal bei 37 °C in Wasserbad durchgeführt, da letzteres der Temperatur im Organismus entspricht (Abb. 9).

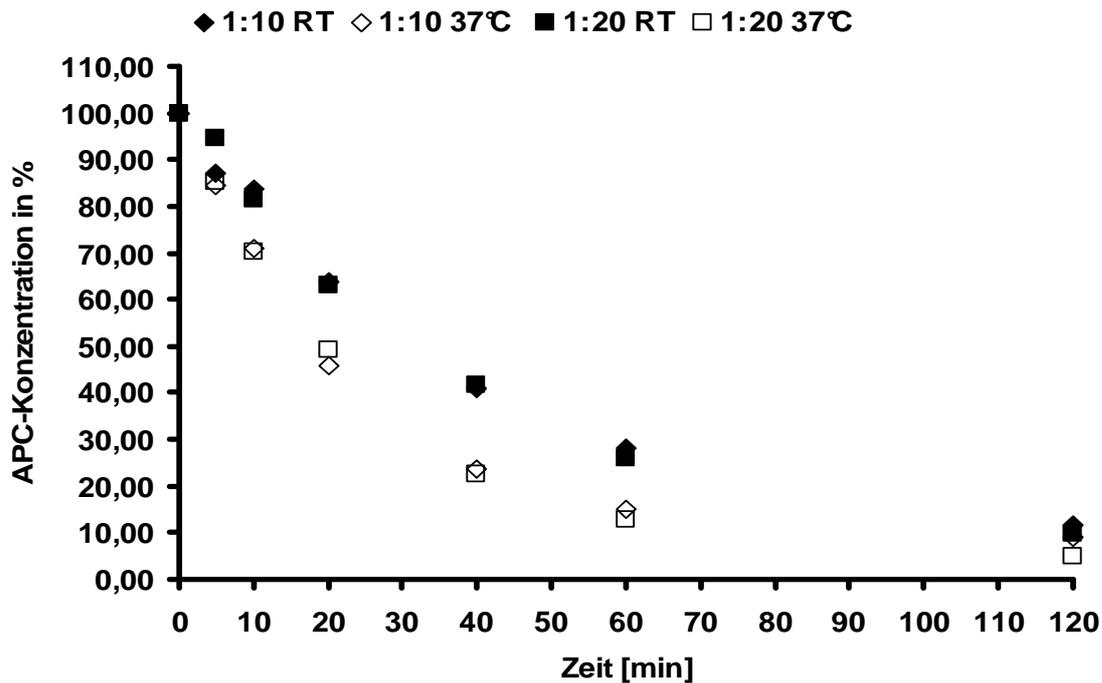


Abb. 9: Inaktivierungskinetik von rAPC bei RT und 37°C, jeweils in den Verdünnungen 1:10 und 1:20, gemessen mittels Enzyme-Capture-Assay

Die errechnete Halbwertszeit des rAPC betrug dabei für die Verdünnungen

1:10 RT	1:10 37°C	1:20 RT	1:20 37°C
31,56 min	18,54 min	31,21 min	19,10 min

Ein weiterer Stoppversuch erfolgte bei 37 °C im Wasserbad mit 1:20 und 1:40 verdünnten Proben, um herauszufinden, ob sich durch diese weitere Verdünnung noch mehr Material sparen lassen könnte. Der Vergleich der beiden Verdünnungsreihen zeigte jedoch einen deutlich flacheren Kurvenverlauf in dem APC-PCI-Komplex-ELISA für die 1:40 verdünnten Proben (Abb. 10).

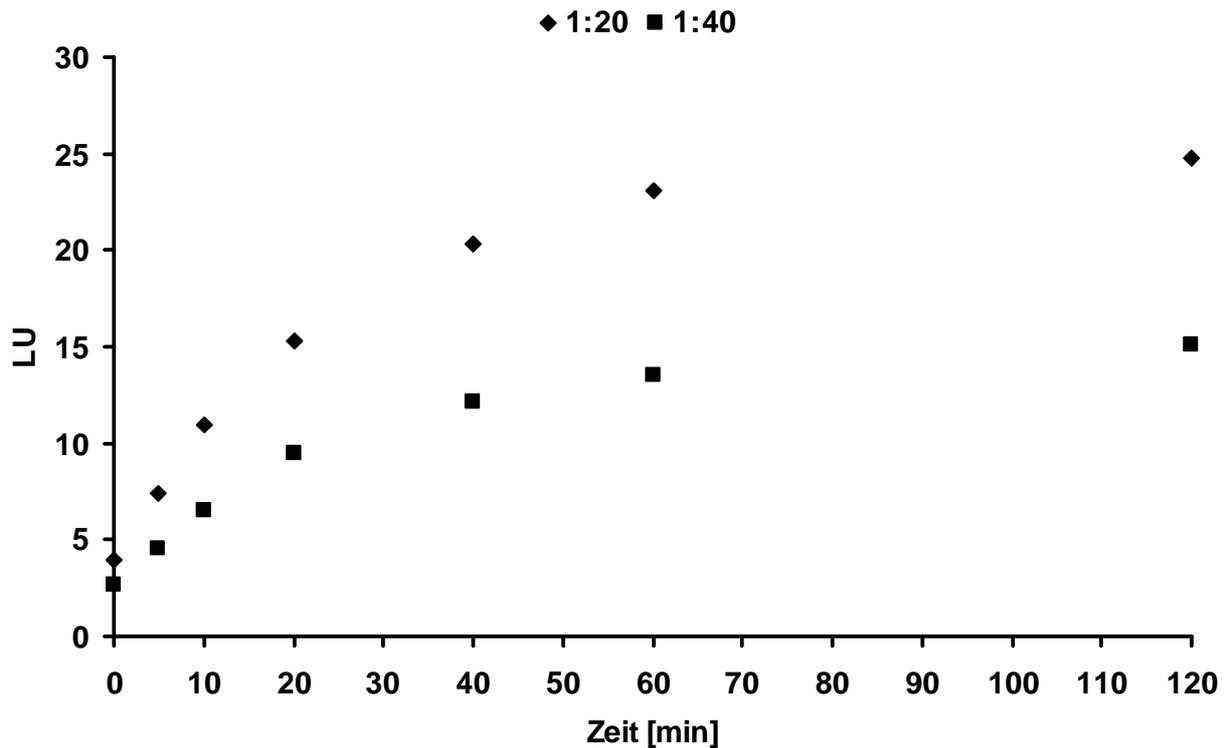


Abb. 10: Aufbau der APC-PCI-Komplexe über den Zeitraum von 120 min unter Verwendung von rAPC, gemessen mittels APC-PCI-Komplex-ELISA
Für alle folgenden Versuche wurden die Proben bei 37 °C im Wasserbad und in einer Verdünnung von 1:20 hergestellt, um bei einer physiologischen Körpertemperatur zu arbeiten und Material zu sparen.

3.3.2 APC-PCI-Komplex-ELISA

Die erste Idee für den Versuchsaufbau bestand darin, die gebildeten APC-PCI-Komplexe mit einem auf der Platte immobilisierten anti-PCI-Antikörper (Goat anti-human Protein C Inhibitor) zu fangen. Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Protein C-Antikörper (Sheep anti-human Protein C) eingesetzt, welcher wiederum durch einen HRP-markierten Sekundärantikörper (Rabbit anti Sheep HRP) nachgewiesen werden sollte. Sowohl der als Catcher verwendete anti-PCI-Antikörper als auch die Proben wurden dabei in verschiedenen Verdünnungen auf die Platte gegeben, um herauszufinden, bei welcher Konzentration ein Anstieg der APC-PCI-Komplexbildung am besten beurteilbar ist. Verwendet wurden hierfür die direkt zu Anfang gestoppte (0 Minuten) und die zuletzt gestoppte Probe (120 Minuten). Die gemessene Lumineszenz zeigte bei keiner der Verdünnungsreihen einen signifikanten Anstieg zwischen den zu 0 und 120 Minuten

gestoppten Proben (Mittelwert der Lumineszenz für Probe 0: 435 µg/ml, Mittelwert der Lumineszenz für Probe 120: 436 µg/ml. Tabelle 1).

PCI-Antikörper		50 µg/ml	25 µg/ml	12,5 µg/ml	6,25 µg/ml	Coating-B
1:10	Probe 0	437,0	420,2	444,3	447,6	21,0
	Probe 120	432,6	417,6	434,9	438,5	26,7
1:20	Probe 0	434,2	422,1	440,0	448,5	27,8
	Probe 120	426,9	405,3	430,9	442,2	27,0
1:40	Probe 0	428,5	410,3	443,8	444,6	20,0
	Probe 120	443,1	426,1	442,4	456,5	14,7
1:80	Probe 0	435,2	424,6	441,8	445,0	10,0
	Probe 120	440,0	440,0	451,2	456,1	7,9

Tabelle 1: APC-PCI-Komplex-ELISA, gemessene Lumineszenzen für die Proben 0 und 120 Minuten, Coating-Buffer als Leerwert mitgeführt.

Um herauszufinden, ob das bisher zum Blocken der Platte verwendete BSA mit den eingesetzten Antikörpern kreuzreagiert, wurde der Versuch mit einem anderen Blockpuffer (Starting Block) wiederholt. Zusätzlich wurden die Antikörperkonzentrationen weiter verdünnt. Auch mit diesem Ansatz ließ sich keinen Komplexaufbau nachweisen.

Um einen direkten Vergleich zwischen den unterschiedlichen Blockpuffern zu gewährleisten, wurde auf der nächsten Platte auf der einen Hälfte Starting Block und auf der anderen BSA-Blockpuffer verwendet. Weiterhin wurde die Platte dieses Mal zuerst mit dem Sheep anti-human Protein C -Antikörper beschichtet und als zweiter Antikörper der Goat anti-PCI-Antikörper eingesetzt, doch auch diese veränderte Reihenfolge ließ keinen Aufbau der Komplexe über die Zeit erkennen. Allerdings gab es auch keinen Unterschied zwischen den beiden verwendeten Blockpuffern, sodass bei den folgenden Versuchen der BSA-Blockpuffer weiterhin verwendet wurde.

Da es aufgrund der Artenverwandtheit zwischen den zur Herstellung der verwendeten Antikörper ausgewählten Tiere zu einer Kreuzreaktion der Antikörper gekommen sein könnte, wurde ein neuer anti-Protein C-Antikörper als Catcher verwendet (Rabbit anti-human Protein C). Als zweiter Antikörper diente weiterhin der Goat anti-human Protein C Inhibitor-Antikörper, sowie der HRP-markierte Sekundärantikörper (Rabbit anti Sheep HRP). Der Versuch wurde mit normalem Poolplasma, APC-Mangelplasma und Plasmaspenden zweier Mitarbeiter durchgeführt. Auch in diesem Versuchsaufbau konnte kein Komplexaufbau nachgewiesen werden.

Nach Bestellung eines neuen, affinitätsgereinigten anti-PCI-Antikörpers (Goat anti-human Protein C Inhibitor (PCI), Affinity-Purified IgG), wurde wie anfänglich noch einmal der anti-PCI-Antikörper als Catcher verwendet, wobei der affinitätsgereinigte Antikörper mit dem bisher verwendeten verglichen wurde. Aufgetragen wurden jeweils die Proben der Zeitpunkte 0 und 120 Minuten in verschiedenen Verdünnungen, weiterhin wurde der Rabbit anti-human Protein C sowie der HRP-markierte Sekundärantikörper Goat anti Rabbit HRP eingesetzt. In dieser Kombination konnte nun erstmalig ein Anstieg der APC-PCI-Komplexe zwischen den jeweiligen Proben beobachten werden (Tabelle 2).

		1:1000		1:2000		1:4000		
		x	Ver	x	Ver	x	Ver	
1:80	1:10	0 min	35,53	2,66	30,77	2,73	28,53	2,66
	120 min	94,34		84,1		75,77		
1:20	0 min	32,82	2,00	28,31	2,08	20,68	2,46	
	120 min	65,72		58,97		50,94		
1:40	0 min	22,97	1,75	19,04	1,89	16,28	2,02	
	120 min	40,12		36,06		32,96		
1:80	0 min	17,49	1,58	14,93	1,82	13,28	1,84	
	120 min	27,59		27,13		24,46		

Tabelle 2: APC-PCI-Komplex-ELISA, x = Mittelwert der gemessenen Lumineszenzen, Ver = Verhältnis zwischen den Proben 0 und 120 Minuten.

Da ein eindeutiger Lumineszenzanstieg unter Verwendung des aufgereinigten PCI-Antikörpers zu erkennen war, wurde dieser für die folgenden Versuche verwendet und ebenso wie der HRP-markierte Sekundärantikörper weiter verdünnt.

Die optimale Konzentration der Antikörper lag schließlich bei

1:4000 für den Goat anti-human Protein C Inhibitor (PCI), Affinity-Purified IgG-Antikörper,

1:2000 für den Rabbit anti-human Protein C-Antikörper und

1:1600 für den Goat anti Rabbit HRP-Antikörper.

Die Proben wurden 1:20 verdünnt und bei 37 °C hergestellt.

(siehe Abb. 8)

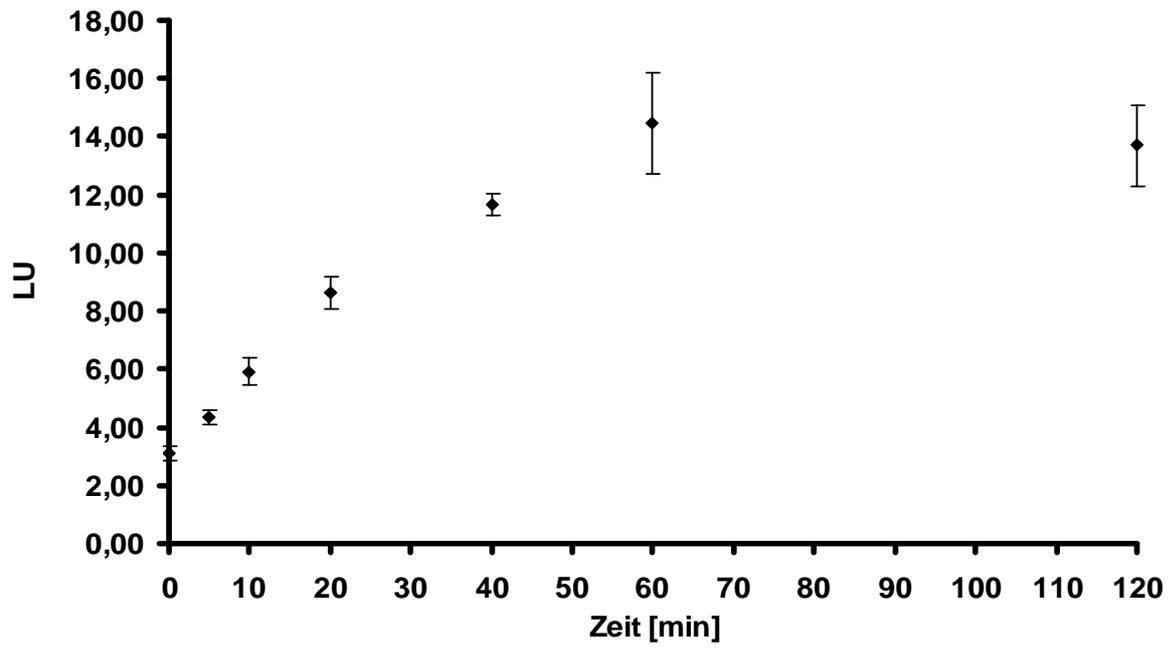


Abb. 11: APC-PCI-Komplex-ELISA, Darstellung von Mittelwerten

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Plasma-Halbwertszeiten von rAPC und pAPC

Das Ziel dieses Versuches war es, herauszufinden, ob sich die Halbwertszeit oder der Komplexaufbau mit PCI des rekombinanten (rAPC, Xigris®) und des plasmabasierten APC (pAPC, Cellsystem) in den eingesetzten Testverfahren unterscheidet. Hierfür wurde mit beiden Proteinen ein neuer Stoppversuch unter gleichen Bedingungen durchgeführt, die Proben anschließend in Doppelwerten gemessen und jeweils Mittelwerte erstellt.

Die Halbwertszeit betrug dabei für das rAPC 20,8 Minuten und für das pAPC 21,2 Minuten, was nicht als signifikanter Unterschied gewertet wurde.

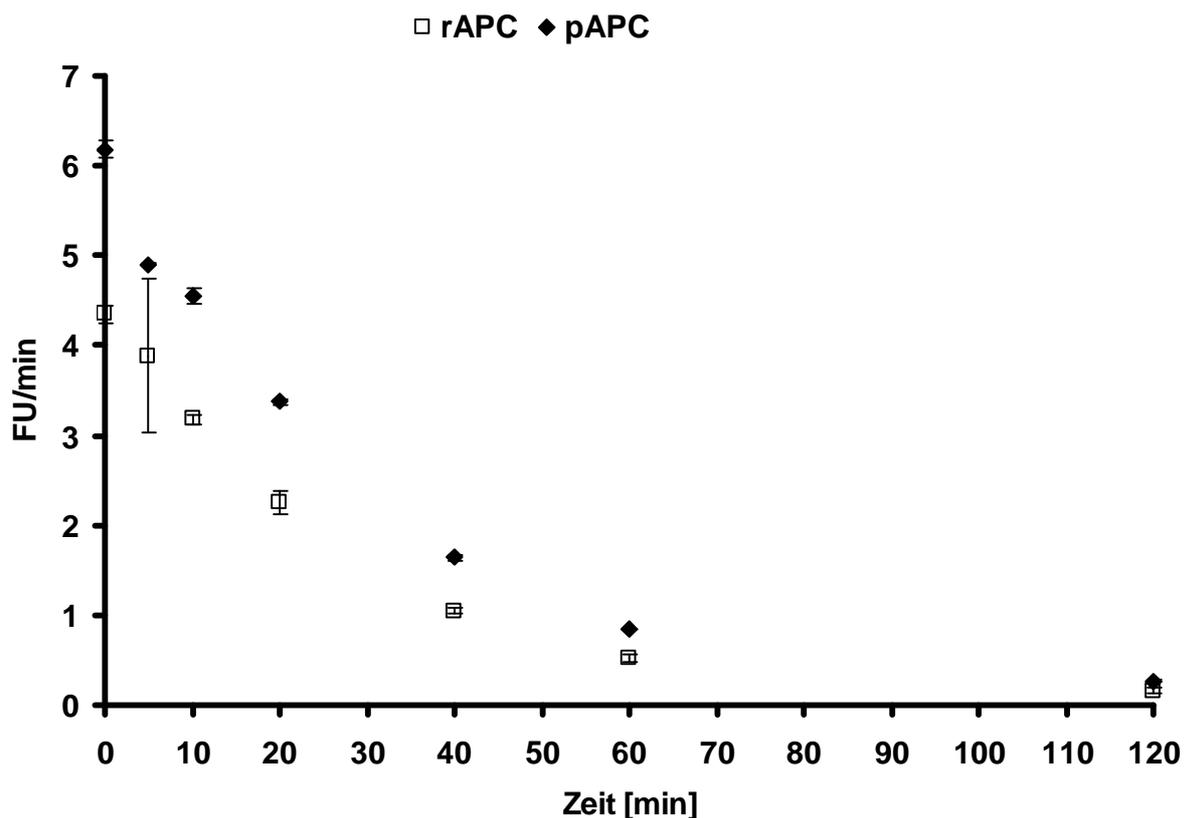


Abb. 12: Enzyme-Capture-Assay, Inhibitionskinetik von rAPC (Xigris®) und pAPC (Cellsystem)

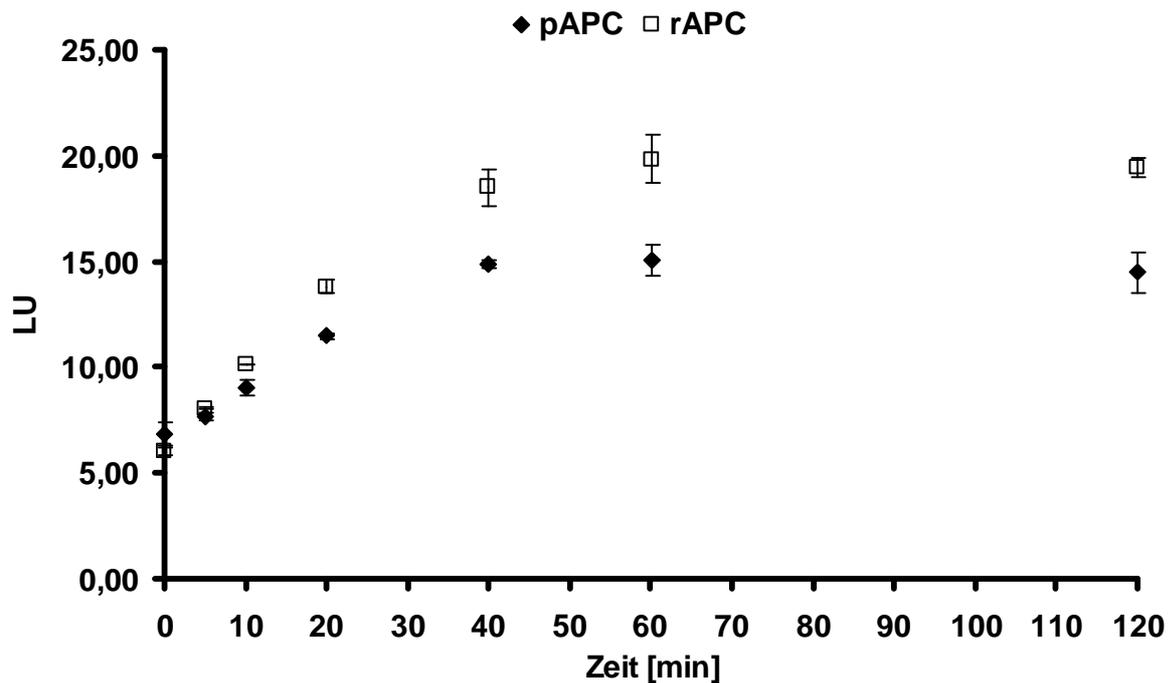


Abb. 13: APC-PCI-Komplex-Elisa, Verwendung von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

Wie anhand der Graphiken zu erkennen ist, bauen sich in dem Enzyme-Capture-Assay zwar etwas mehr APC-PCI-Komplexe unter Verwendung des rAPC auf, die Halbwertszeiten unterscheiden sich jedoch nur marginal. Unter Verwendung des Captured-Enzyme-Assays ist dagegen kein Unterschied im Kurvenverlauf erkennbar (siehe Abb. 14 und 15).

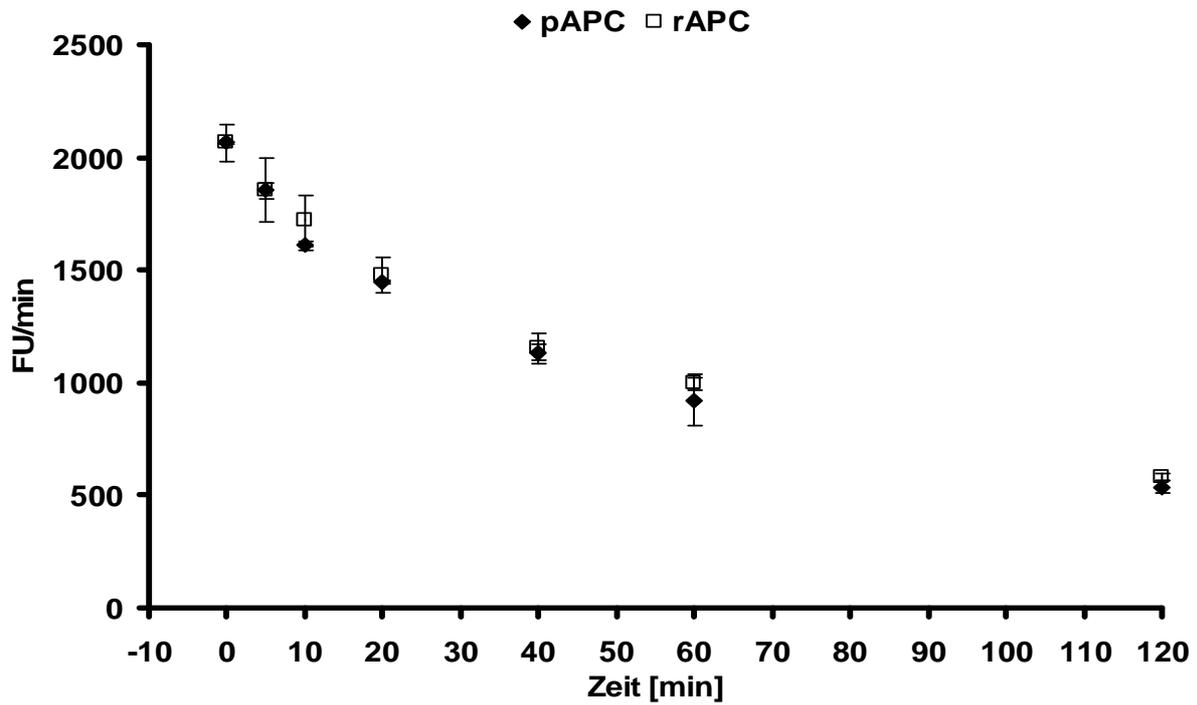


Abb. 14: Captured-Enzyme-Assay, Inhibitionskinetik von immobilisiertem rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

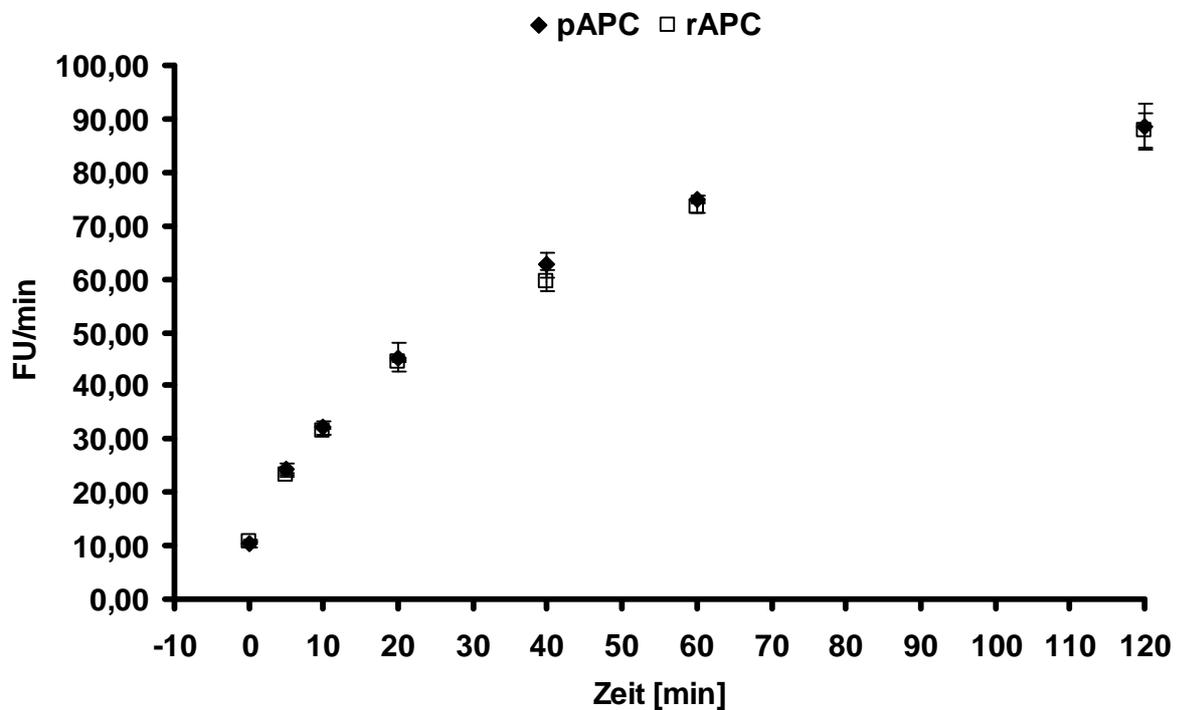


Abb. 15: Captured-Enzyme-Assay, Verwendung von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

4.2 Einfluss von Heparin auf die APC-Halbwertszeit

4.2.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin (UFH, Liquemin®)

Dieser Ansatz galt der Fragestellung, in wie fern die Halbwertszeit von APC durch UFH (Liquemin®) beeinflusst wird. Um dies zu testen, wurde Liquemin in verschiedenen Konzentrationen (0 U/ml, 0,1 U/ml, 1 U/ml) zu dem verwendeten Plasma gegeben. Auch hier wurde der Ansatz gleichzeitig mit rAPC und pAPC durchgeführt, um einen eventuell vorhandenen Unterschied herauszuarbeiten.

Liquemin®	0 U/ml	0,1 U/ml	1 U/ml
HWZ rAPC	19,0	15,5	11,5
HWZ pAPC	21,8	18,2	13,0

Tabelle 3: Vergleich der HWZ (min) von rAPC und pAPC, gemessen mittels Enzyme-Capture-Assay, Berechnung der HWZ wie oben beschrieben.

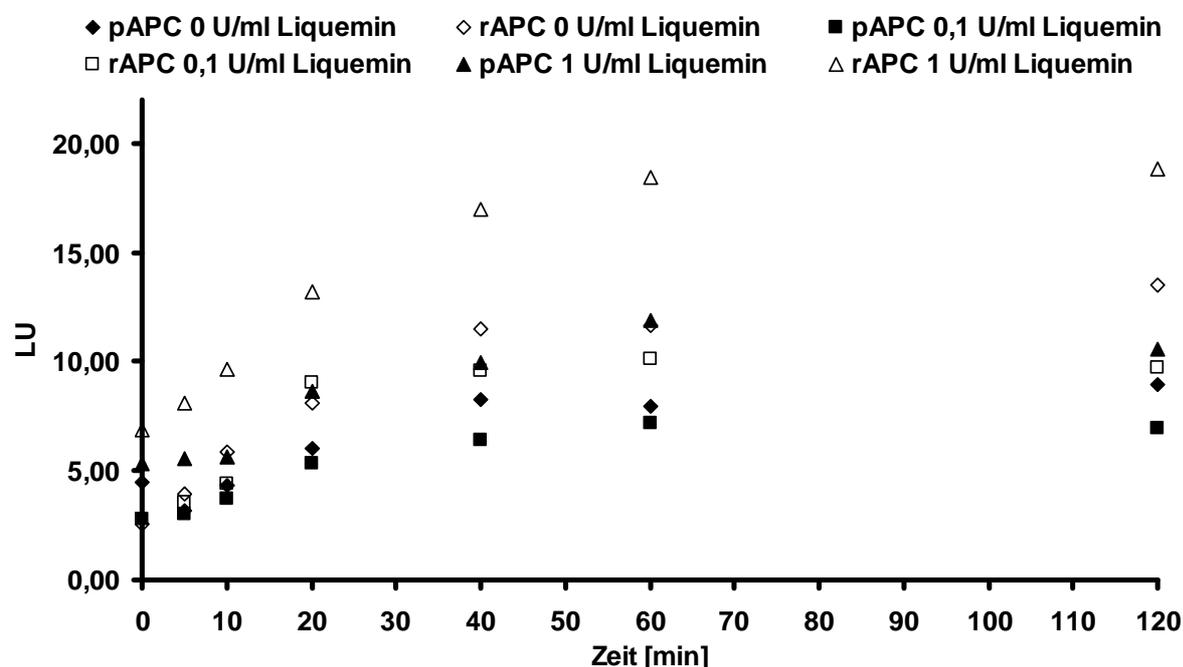


Abb. 16: APC-PCI-Komplex-Elisa, Einfluss von Liquemin® in verschiedenen Konzentrationen, Vergleich von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten.

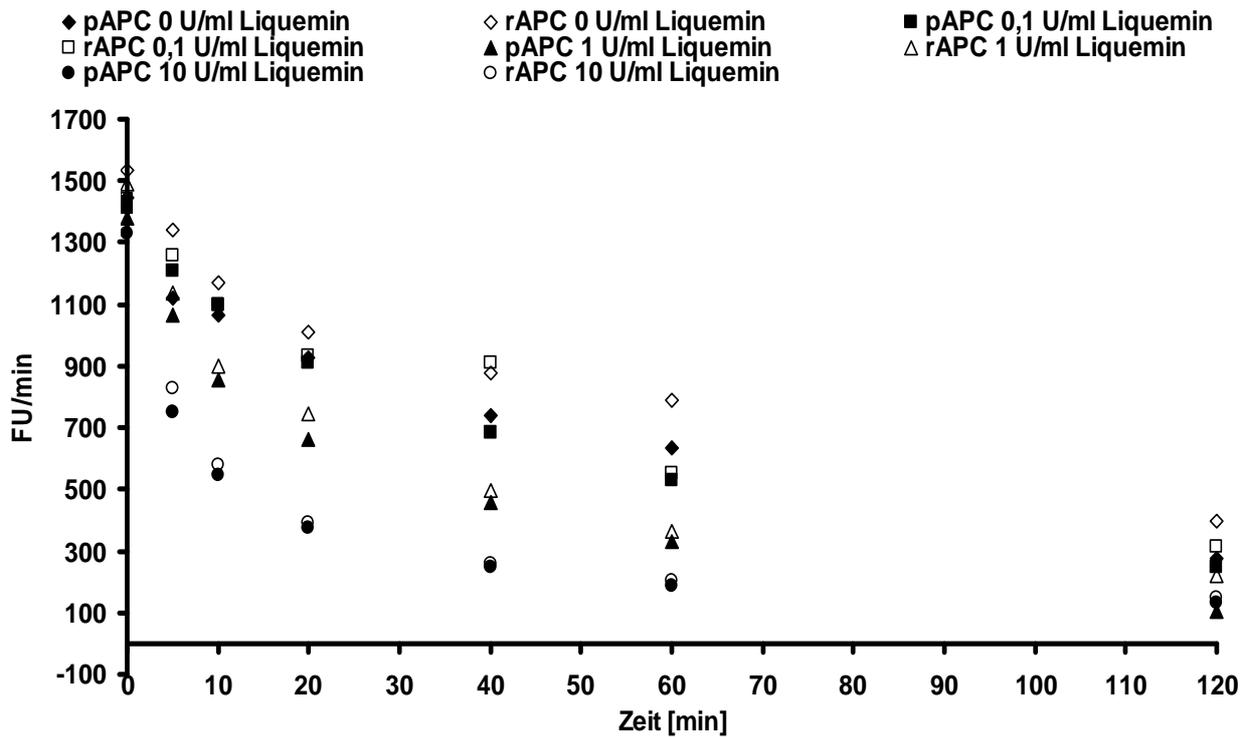


Abb. 17: Captured-Enzyme-Assay, Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC und pAPC unter dem Einfluss von Liquemin® in verschiedenen Konzentrationen, Darstellung von Mittelwerten

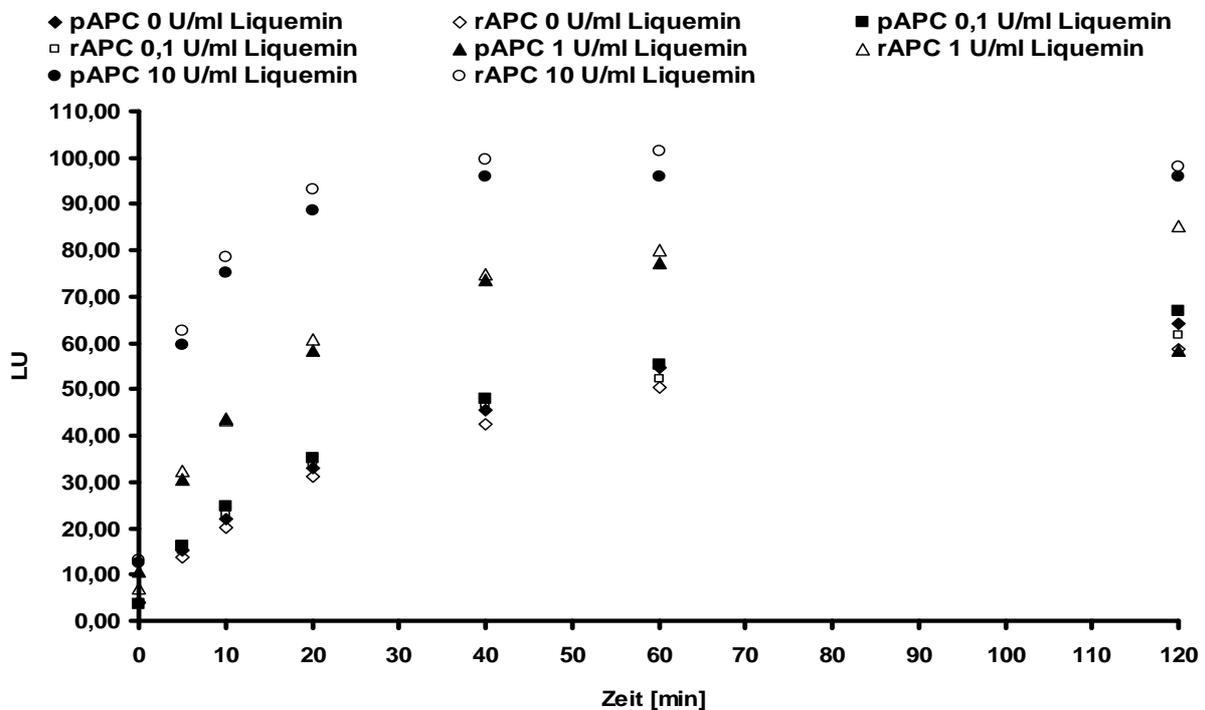


Abb. 18: Captured-Enzyme-Assay, Komplexbildung von rAPC und pAPC mit PCI unter dem Einfluss von Liquemin® in verschiedenen Konzentrationen, Darstellung von Mittelwerten

Sowohl in dem Captured-Enzyme-Assay, als auch in dem Enzyme-Capture-Assay und APC-PCI-Komplex-ELISA zeigt sich, dass die HWZ von APC sinkt, bzw. der Komplexaufbau zunimmt, je höher die Liquemin[®]-Konzentration ist, wobei eine Konzentration von 0,1 U/ml nur einen geringen Einfluss zu haben scheint. Ein Unterschied zwischen rAPC und pAPC lässt sich dabei in dem APC-PCI-Komplex-ELISA (Abb. 16), sowie in dem Enzyme-Capture-Assay (Tabelle 3) nachweisen. Hier zeigt sich ein stärkerer Einfluss des UFH auf das rAPC, welches unter Zugabe von Liquemin[®] mehr Komplexe mit PCI eingeht und eine etwas kürzere Halbwertszeit aufweist. Dagegen unterscheidet sich die HWZ der beiden Proteine, beziehungsweise der Komplexaufbau von APC und PCI im Captured-Enzyme-Assay nur marginal.

4.2.2 Einfluss verschiedener Heparine mit unterschiedlichen Molekulargewichten

Ziel dieses Versuches war herauszufinden, ob verschiedene Heparine einen unterschiedlichen Einfluss auf APC hinsichtlich seiner HWZ und Komplexbildung mit PCI haben. Hierfür wurden Liquemin[®] als unfraktioniertes Heparin, Enoxaparin-Natrium (Clexane[®]) und Nadroparin-Kalzium (Fraxiparin[®]) als niedermolekulare Heparine, Danaparoid-Natrium (Orgaran[®]), welches zu 84 % aus niedermolekularem Heparansulfat besteht, sowie Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]), ein synthetisch hergestelltes Pentasaccharid, benutzt.

Es wurde der Einfluss von je 0,1 U/ml, 1 U/ml und 10 U/ml auf das rAPC im Vergleich zu nativem Poolplasma gemessen.

	0,1 U/ml	1 U/ml	10 U/ml
Pool ohne Heparin	28,86	-	-
Liquemin [®]	20,83	16,26	4,77
Clexane [®]	19,16	16,75	7,72
Fraxiparin [®]	17,52	15,39	6,89
Orgaran [®]	16,79	18,23	11,23
Arixtra [®]	19,30	18,03	18,95

Tabelle 4: Halbwertszeit (min) von rAPC in gepooltem Citratplasma unter dem Einfluss verschiedener Heparine, Messung mittels Enzyme-Capture-Assay.

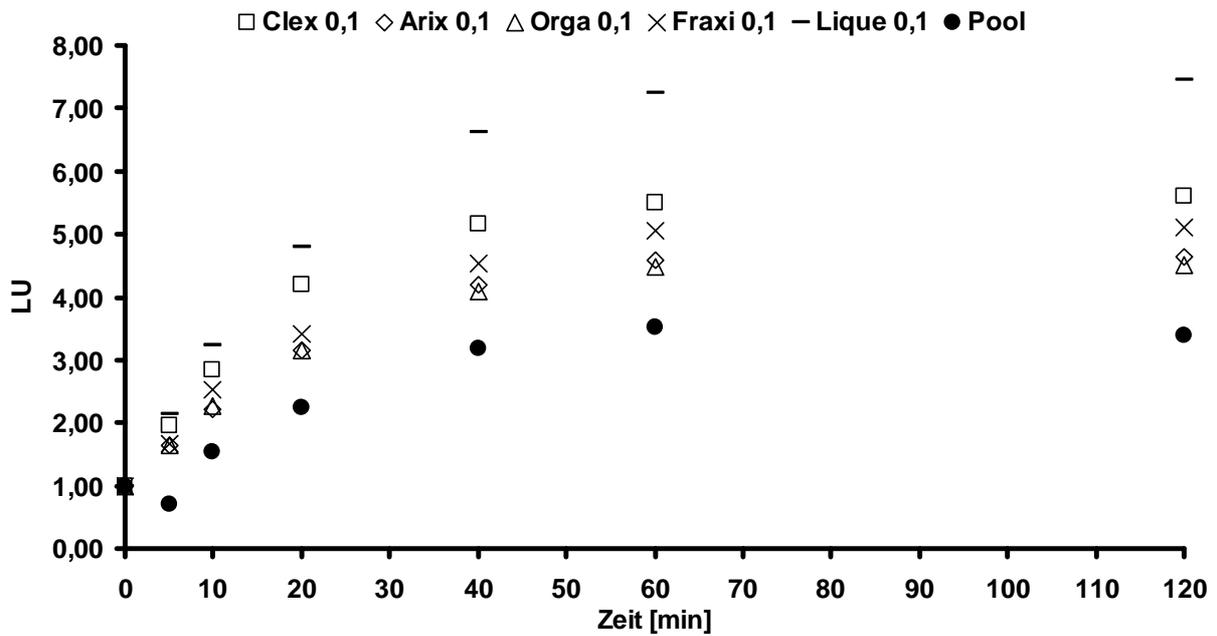


Abb. 19: APC-PCI-Komplex-ELISA, Verwendung von rAPC unter Einfluss verschiedener Heparine in der Konzentration von 0,1 U/ml, Darstellung von Mittelwerten

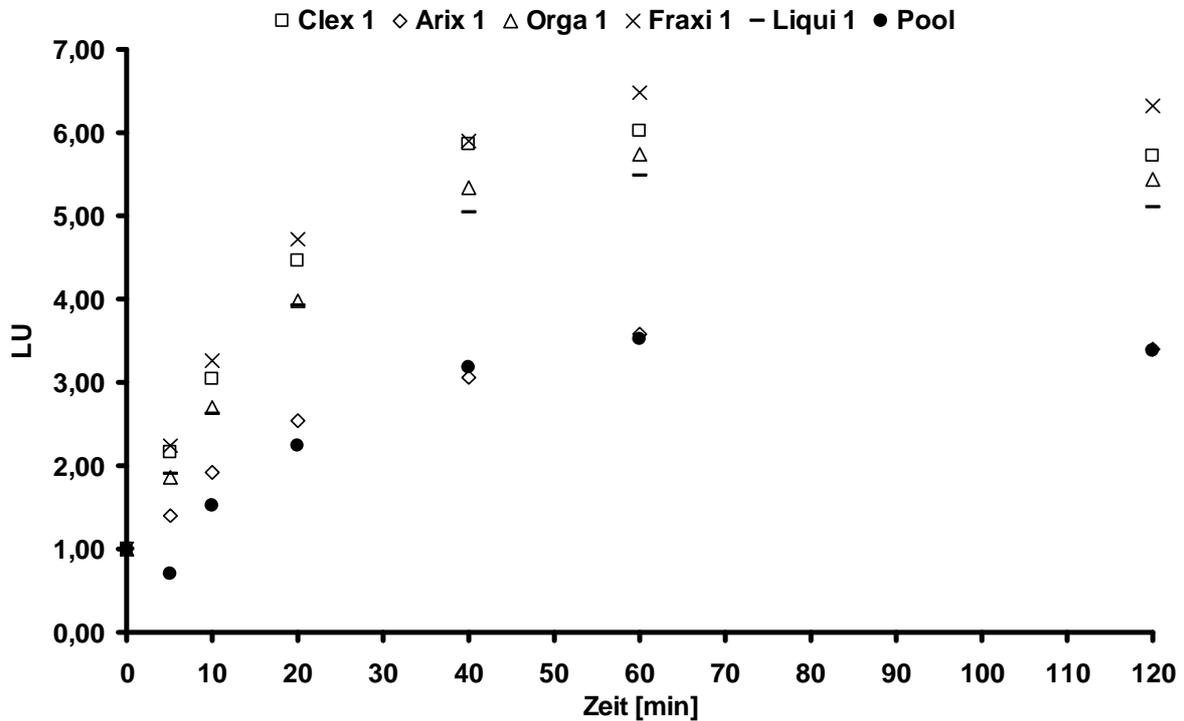


Abb. 20: APC-PCI-Komplex-ELISA, Verwendung von rAPC unter Einfluss verschiedener Heparine in der Konzentration von 1 U/ml, Darstellung von Mittelwerten

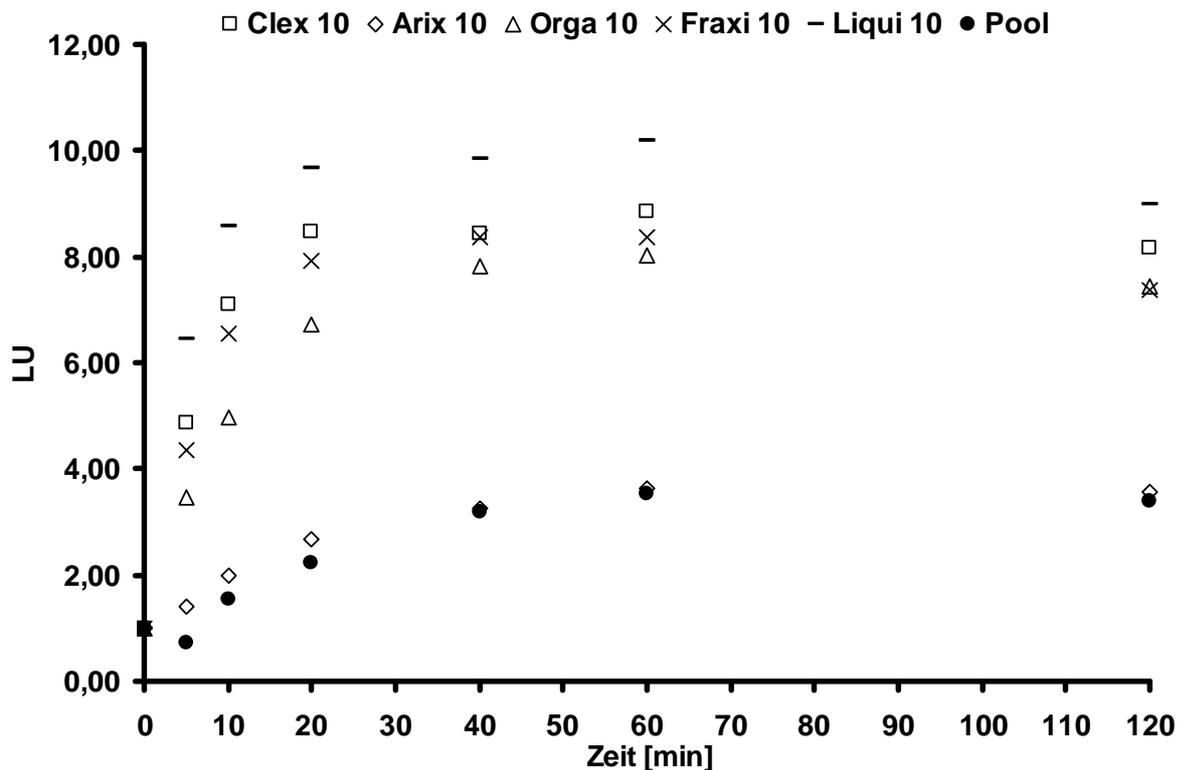


Abb. 21: APC-PCI-Komplex-ELISA, Verwendung von rAPC unter Einfluss verschiedener Heparine in der Konzentration von 10 U/ml, Darstellung von Mittelwerten

Während unter dem Einfluss von Arixtra[®] alle Kurven nahezu identisch mit der des nicht mit Heparin versetzten Poolplasmas verlaufen (Abb. 19-21), zeigen sich bei den anderen Heparinen ab einer Konzentration von 1 U/ml deutliche Unterschiede in der Halbwertszeit und dem Aufbau der APC-PCI-Komplexe. Orgaran[®] zeigt zwar ähnlich wie Arixtra[®] bei einer Konzentration von 1 U/ml noch keinen Abfall der Halbwertszeit (Tabelle 4), dafür jedoch einen erheblichen Anstieg der Komplexbildung (Abb. 20). Interessanter Weise verändert sich die Halbwertszeit selbst bei einer Zugabe von 10 U/ml Arixtra[®] zu den Proben nicht, während sie unter dem Einfluss der anderen Heparine auf 5 bis 7 Minuten abfällt (Tabelle 4).

4.2.3 Direkter Vergleich des Einflusses verschiedener Heparine

Um wieder einen Vergleich zwischen dem rAPC und pAPC herzustellen, wurde der Test erneut mit beiden Enzymen durchgeführt, dieses Mal jedoch nur unter Verwendung eines unfraktionierten (Liquemin[®]), eines niedermolekularen (Clexane[®]) Heparins und

des synthetisch hergestellten Arixtra[®], wobei zum Vergleich der beiden Proteine mittels des Enzyme-Capture-Assay und APC-PCI-Komplex-ELISA eine Konzentration von 1 U/ml gewählt wurde.

	rAPC	pAPC
Clexane [®]	13,87	14,45
Arixtra [®]	15,44	17,39
Liquemin [®]	13,83	15,26
Pool	18,98	18,67

Tabelle 5: Messung mittels Enzyme-Capture-Assay und Berechnung der HWZ in Minuten von rAPC und pAPC unter dem Einfluss von 1 U/ml verschiedener Heparine

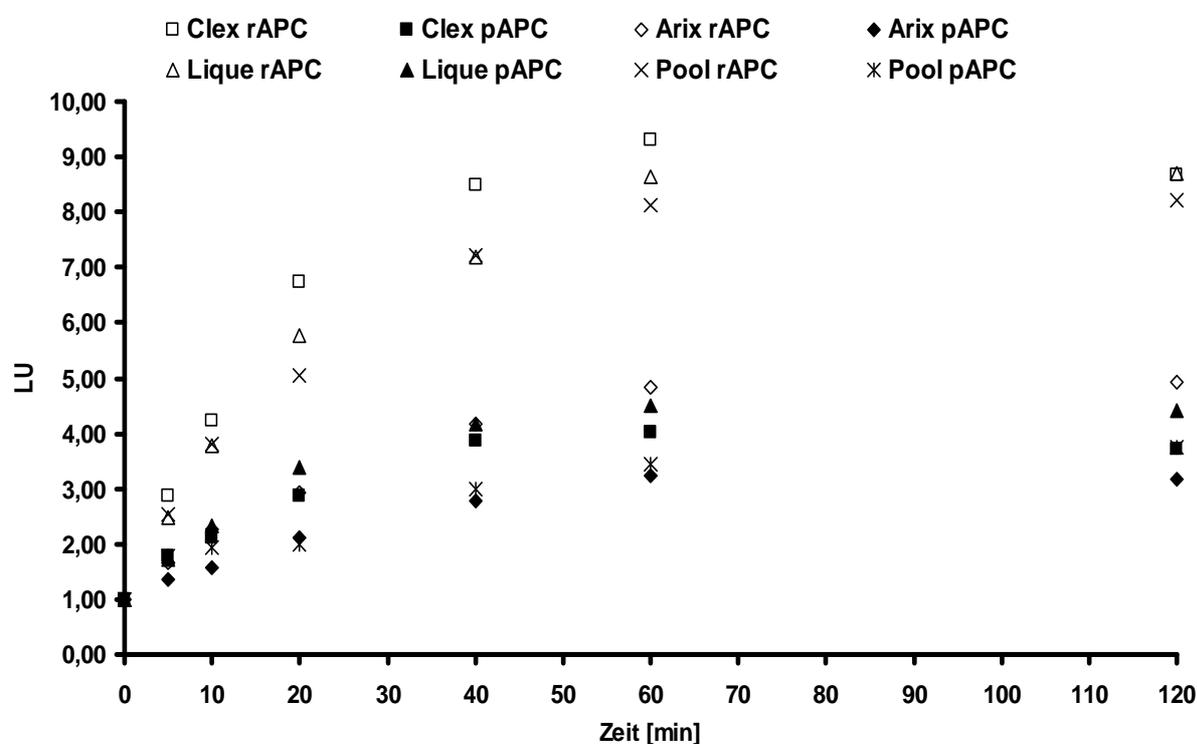


Abb. 22: APC-PCI-Komplex-ELISA unter dem Einfluss von 1 U/ml verschiedener Heparine, Vergleich zwischen rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

Es ist erkennbar, dass die HWZ des pAPC unter dem Einfluss der Heparine etwas über der HWZ des rAPC liegt (1,3 min). Weiterhin zeigt sich, dass das pAPC weniger Komplexe unter Zugabe von Heparin aufbaut. Dabei wird auch deutlich, dass Arixtra[®] dennoch einen schwächeren Einfluss auf die Komplexbindung ausübt als das unfractionierte und niedermolekulare Heparin.

Da es in dem Captured-Enzyme-Assay einfacher ist, viele Heparinkonzentrationen unter den gleichen Bedingungen zu messen, wurden hier die drei ausgewählten Heparine in den Konzentrationen 10 U/ml, 1 U/ml und 0,1 U/ml in Poolplasma gegeben und auf die mit rAPC bzw. pAPC versehenen Platten aufgetragen.

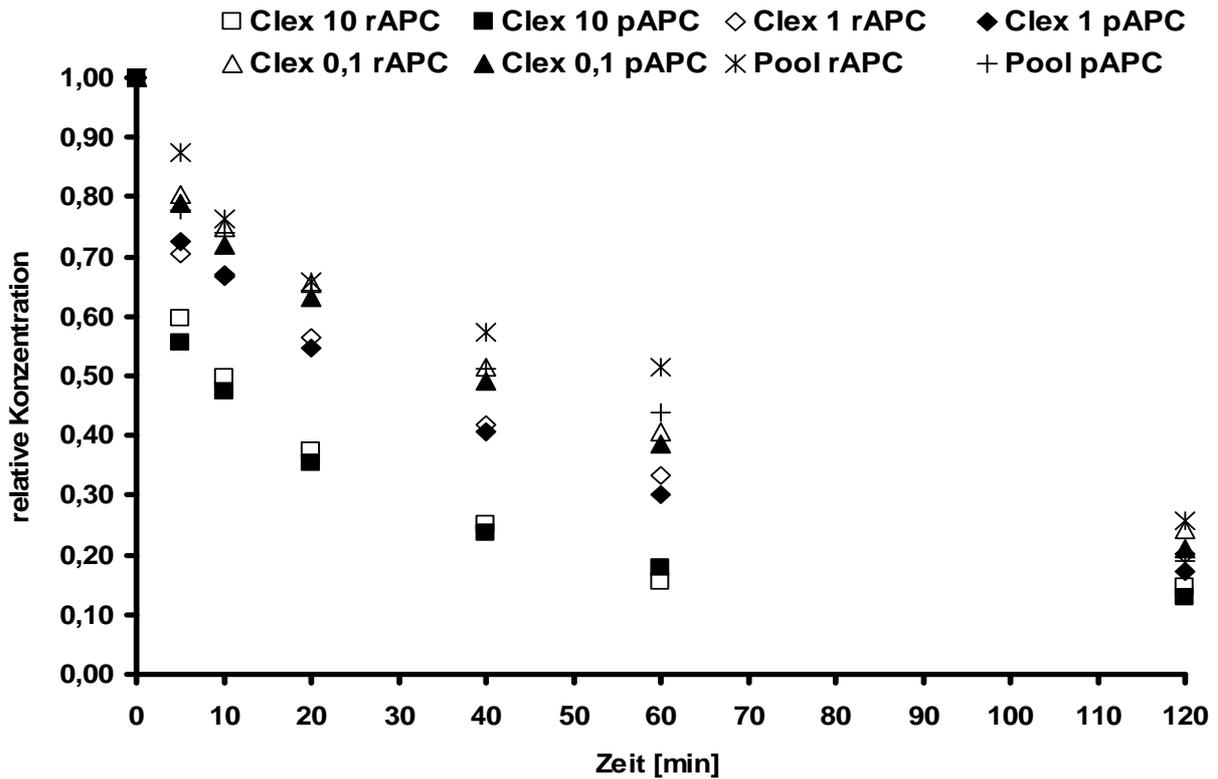


Abb. 23: Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC und pAPC unter dem Einfluss von Clexane® in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 U/ml) mittels des Captured-Enzyme-Assay, Darstellung der relativen APC-Konzentration y-Achse beschriftet! Maßseinheit!???

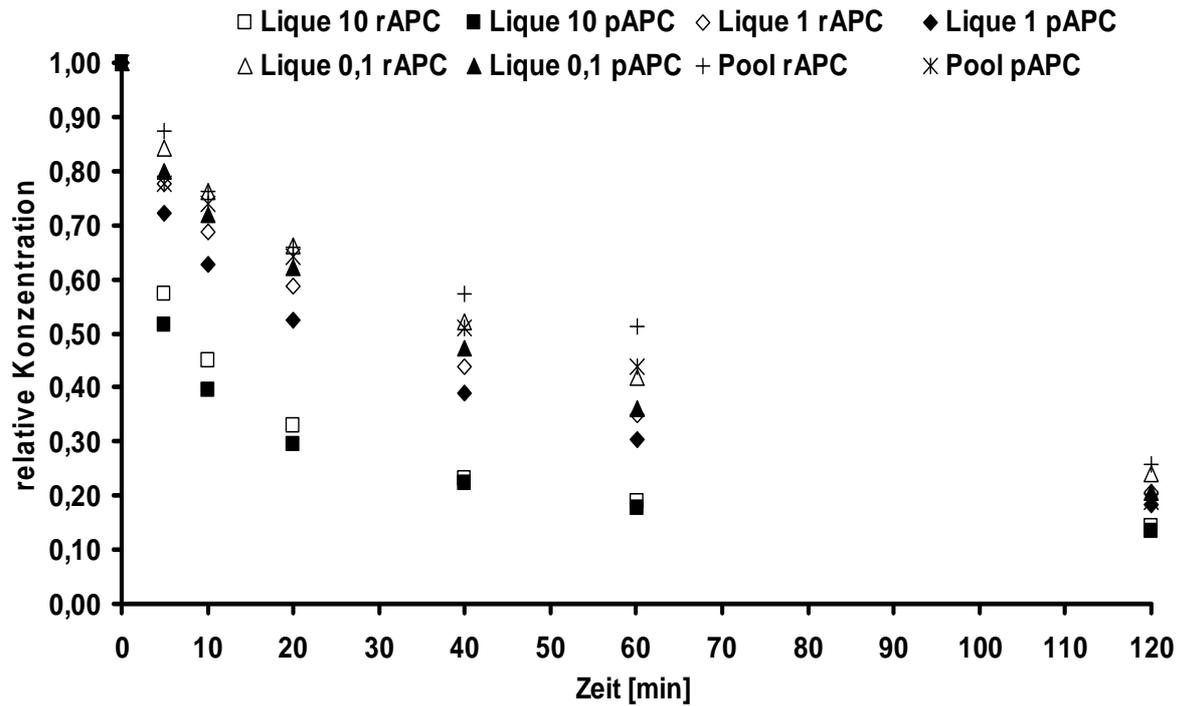


Abb. 24: Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC und pAPC unter dem Einfluss von Liqueimin® in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 U/ml) mittels des Captured-Enzyme-Assay, Darstellung der relativen APC-Konzentration

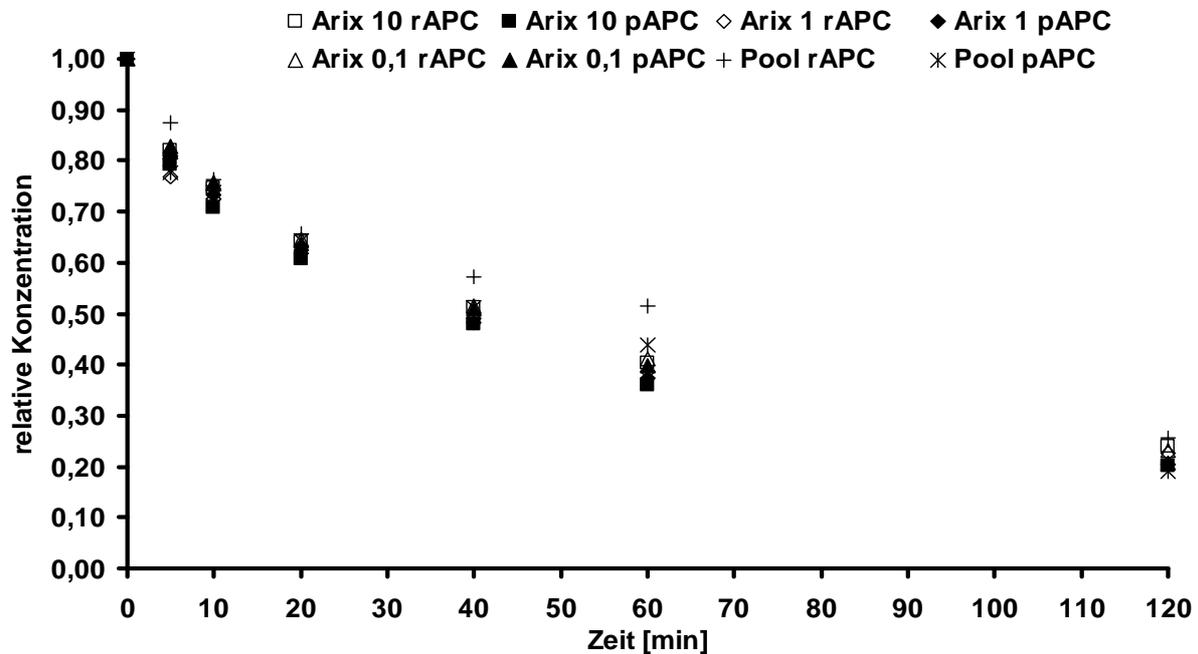


Abb. 25: Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC und pAPC unter dem Einfluss von Arixtra® in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 U/ml) mittels des Captured-Enzyme-Assay, Darstellung der relativen APC-Konzentration

Dabei zeigte wie auch in dem vorherigen Test sowohl bei den Clexane®-Konzentrationen (Abb. 23) als auch beim Liquemin® (Abb. 24) ein Abfall der APC-Halbwertszeit, welcher mit steigender Konzentration immer deutlicher wurde, wobei das pAPC marginal weniger beeinflusst wurde. Die APC-HWZ blieb unter dem Einfluss von Arixtra® (Abb. 25) hingegen vollkommen unbeeinflusst.

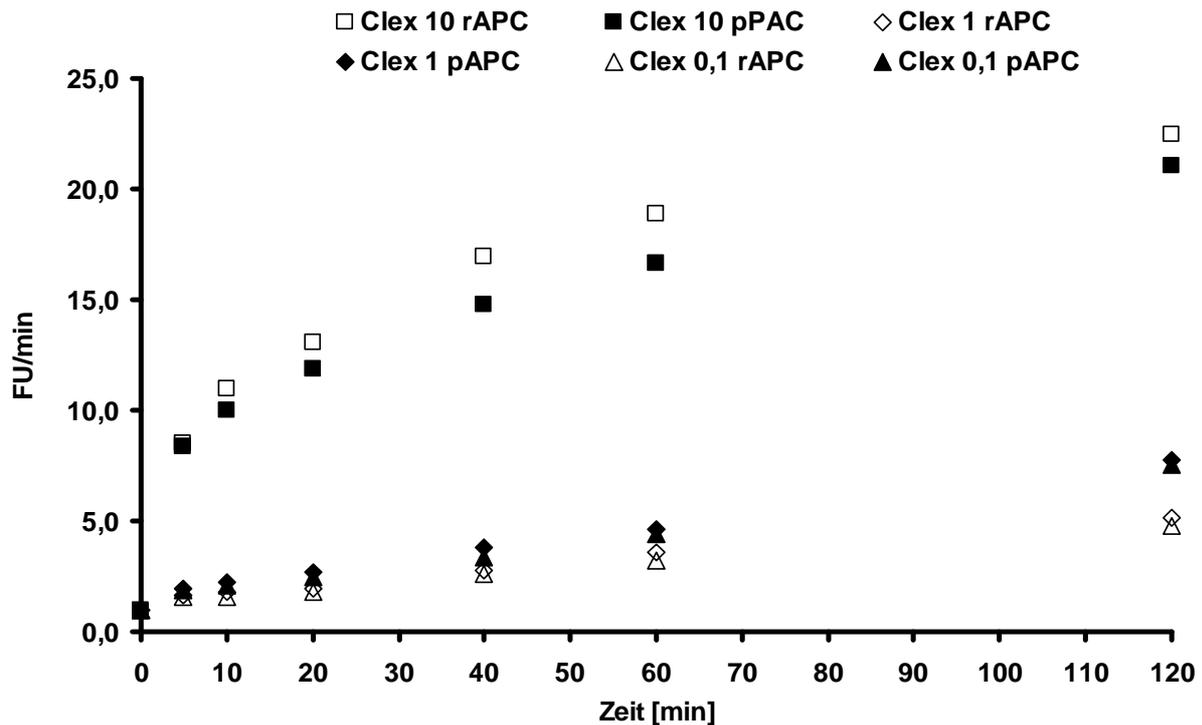


Abb. 26: Darstellung der APC-PCI-Komplexbildung mittels des Captured-Enzyme-Assay unter dem Einfluss von Clexane® in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 U/ml), Vergleich von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

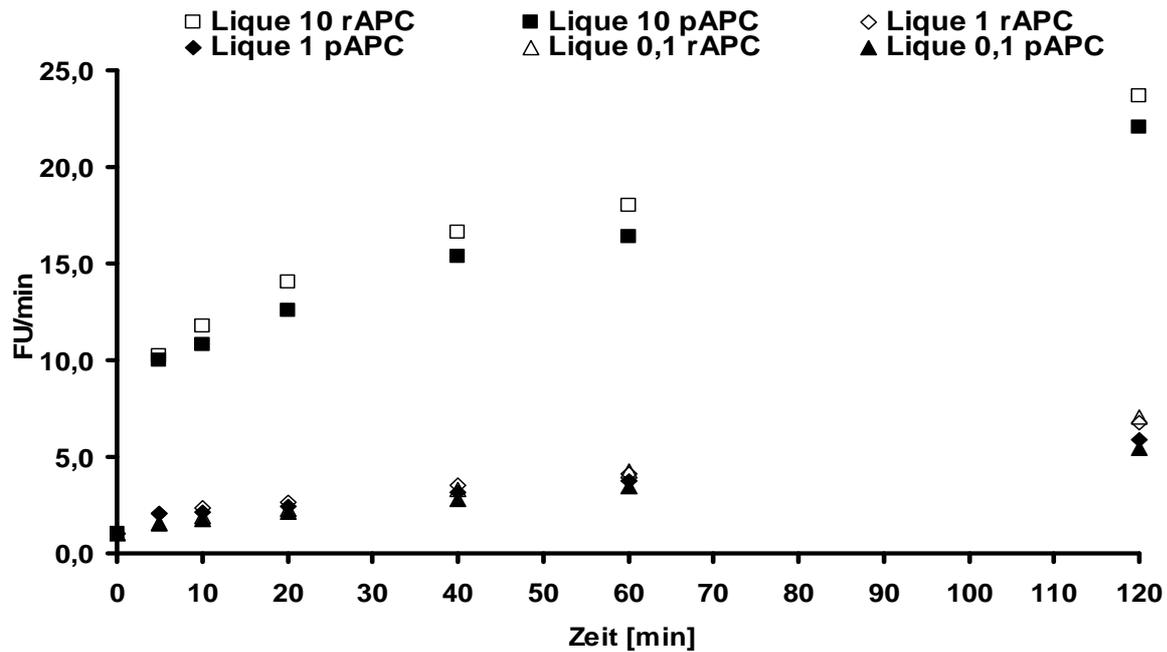


Abb. 27: Darstellung der APC-PCI-Komplexbildung mittels des Captured-Enzyme-Assay unter dem Einfluss von Liquemin[®] in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 U/ml), Vergleich von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten

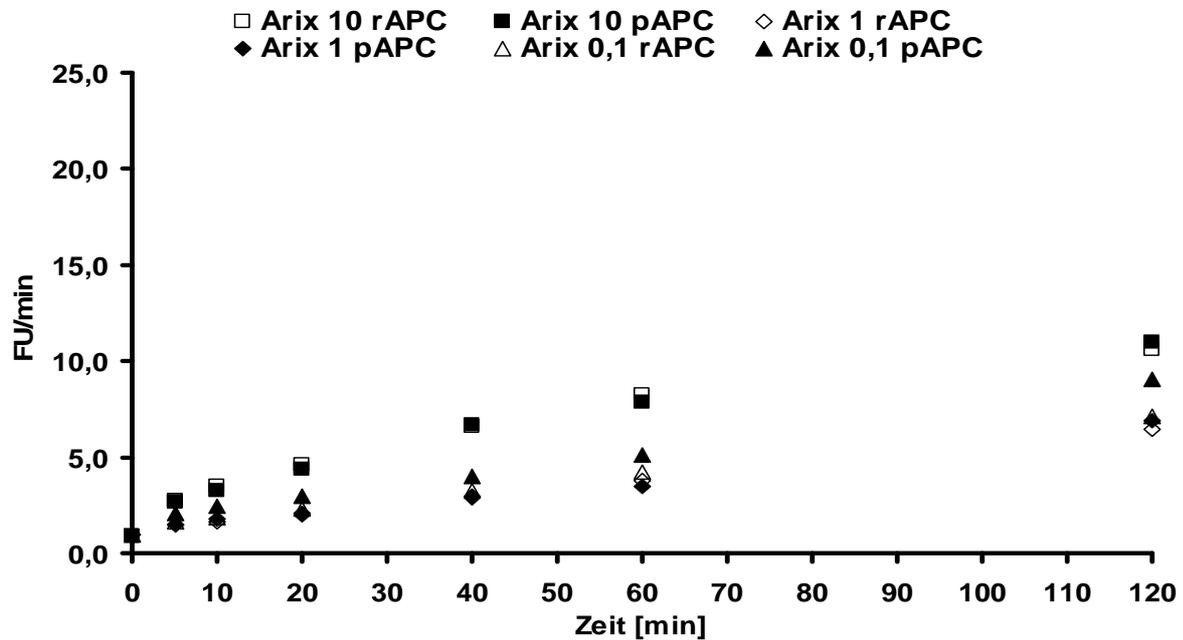


Abb. 28: Darstellung der APC-PCI-Komplexbildung mittels des Captured-Enzyme-Assay unter dem Einfluss von Arixtra[®] in verschiedenen Konzentrationen (10U/ml, 1U/ml, 0,1 U/ml), Vergleich von rAPC und pAPC, Darstellung von Mittelwerten.

Auch die APC-PCI Komplexe nehmen selbst bei Konzentrationen von 10 U/ml Arixtra[®] (Abb. 28) nur leicht zu, während sich unter Zugabe von Clexanen[®] (Abb. 26) und Liquemin[®] (Abb. 27) dieser Konzentration deutliche Anstiege beobachten lassen. Ein Unterschied zwischen dem synthetischen und biologischen APC ist dabei nur in den höchsten Konzentrationen minimal erkennbar, wobei das biologische APC etwas weniger Komplexe unter dem Heparineinfluss aufbaut.

4.3 Einfluss von Aptameren auf die Halbwertszeit von rAPC

Wie schon von Müller et al. beschrieben, beschleunigt die Anwesenheit der HS02-Aptamere in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes analog zu Heparin die Bildung von APC-PCI-Komplexen (Müller et al., 2009b). Um diesen Effekt nachzuweisen, wurden Aptamere verschiedener Länge in einer Konzentration von jeweils 100 nM zu Poolplasma gegeben und ihr Einfluss auf die Halbwertszeit des rAPC und die Komplexbildung mit PCI mittels des Captured-Enzyme-Assay bestimmt. Dabei wurden folgende Aptamere verwendet:

HS02-44G als kürzestes Molekül

HS02-52G, welches die effektivste HS02-Variante darstellt und

HS02-88G als längstes Molekül.

Die Ergebnisse sind in Abb. 29 und 30 dargestellt.

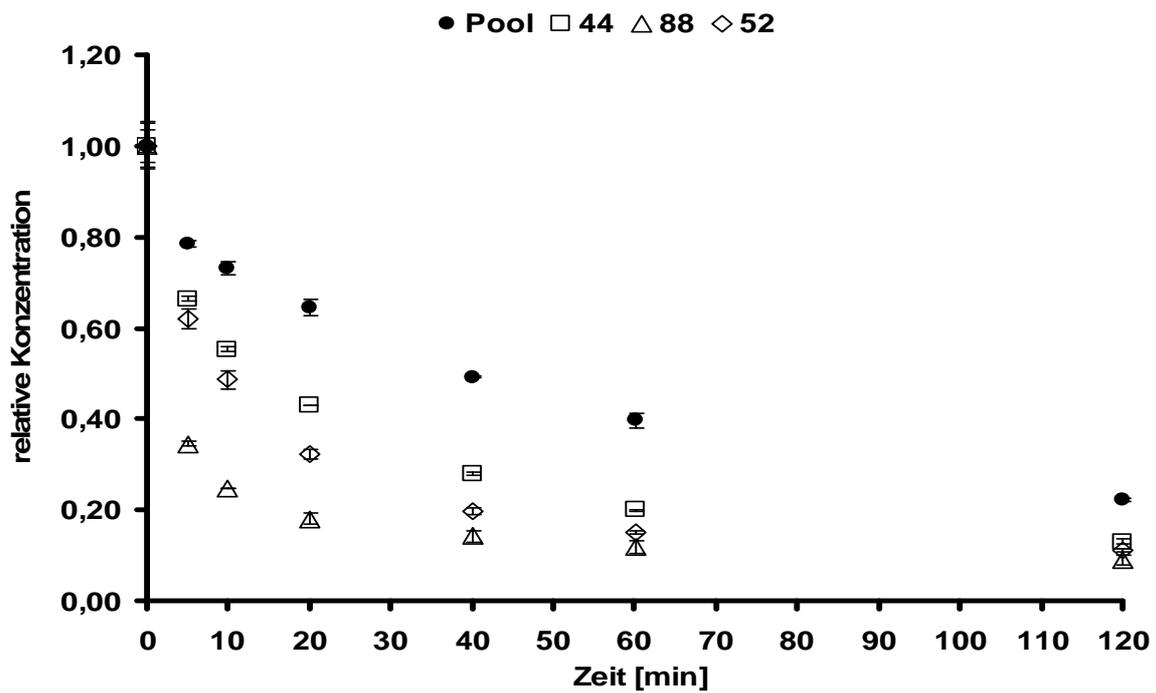


Abb. 29: Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC mittels Captured-Enzyme-Assay unter dem Einfluss der HS02-Aptamere 44G, 52G und 88G in einer Konzentration von 100nM, Darstellung der relativen APC-Konzentration

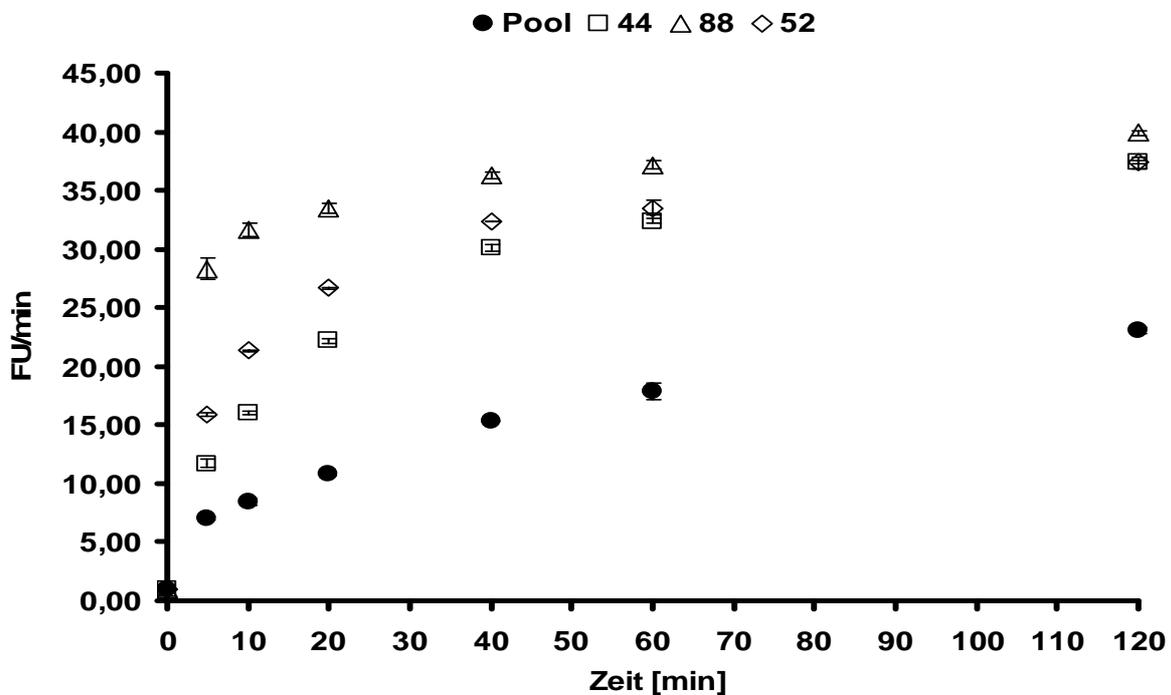


Abb. 30: Darstellung der rAPC-PCI-Komplexbildung mittels des Captured-Enzyme-Assay unter dem Einfluss der HS02-Aptamere 44G, 52G und 88G in einer Konzentration von 100nM, Darstellung von Mittelwerten

Es ist erkennbar, dass die Halbwertszeit des rAPC mit steigendem Molekulargewicht der Aptamere ab- und analog dazu die Komplexbildung mit PCI zunahm.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Konzentration des im Enzyme-Capture-Assay verwendeten Aptameres HS02-52G in einer Halblogarithmischen Verdünnungsreihe, beginnend mit 100 nM, verdünnt. Die jeweiligen Konzentrationen betragen:

HS02-52G: 100 nM 31,6 nM 10 nM 3,16 nM 1 nM

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

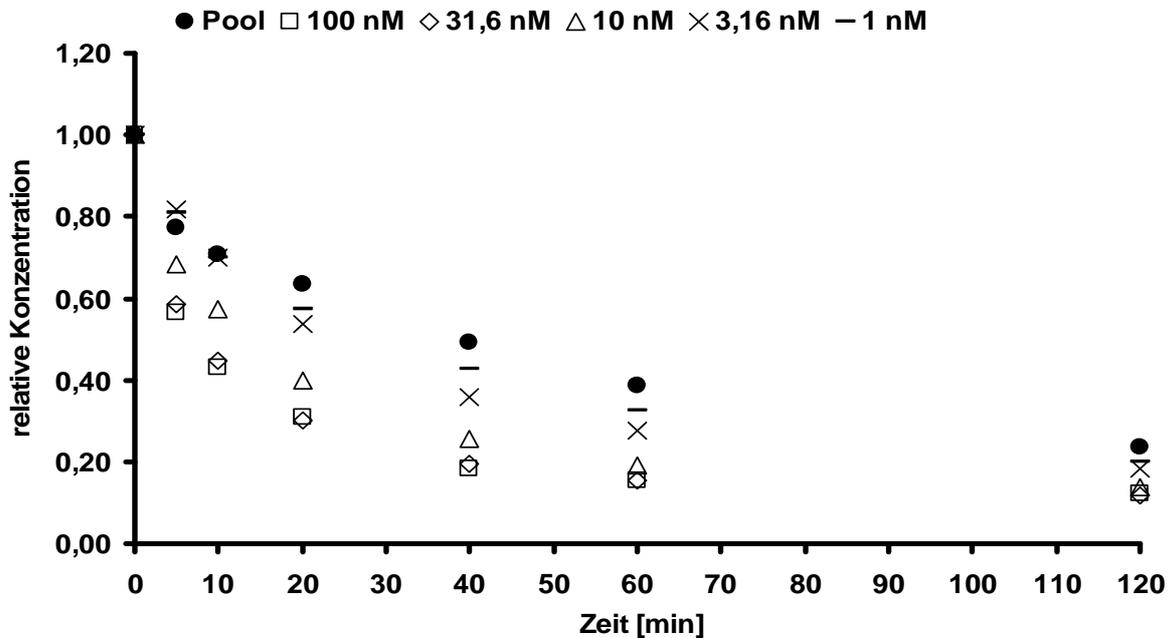


Abb. 31: Darstellung der Inhibitionskinetik von rAPC mittels Captured-Enzyme-Assay unter Einfluss von HS02-52G in verschiedenen Verdünnungen, Darstellung von Mittelwerten

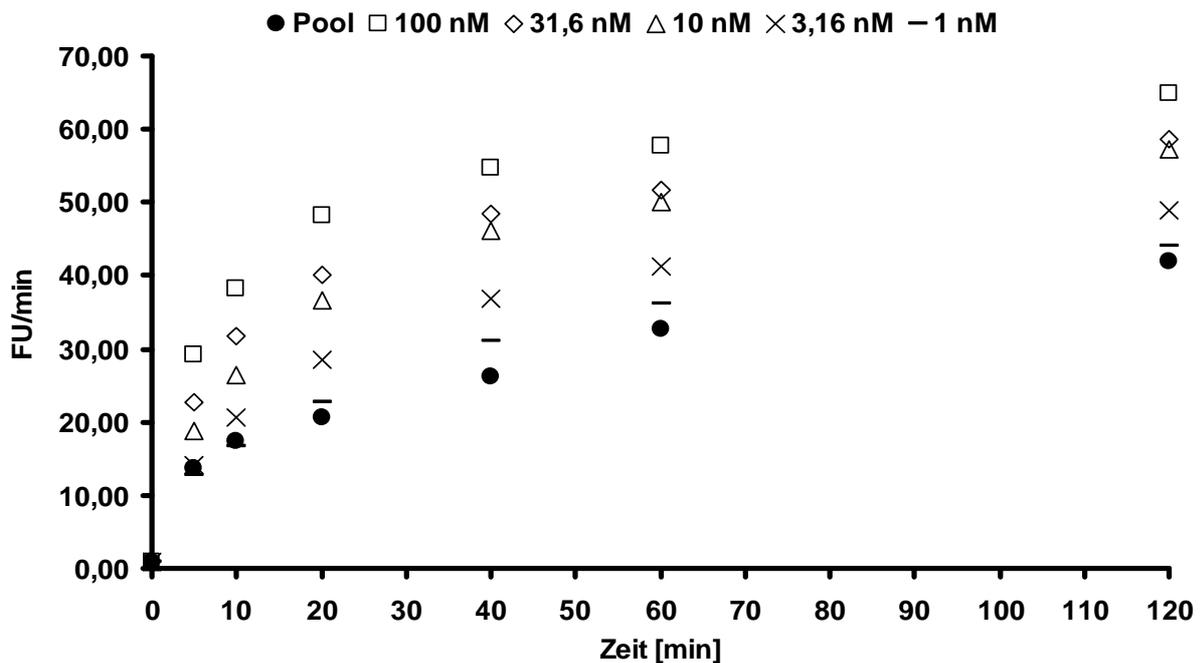


Abb. 32: Darstellung der rAPC-PCI-Komplexbildung mittels des Captured-Enzyme-Assay unter Einfluss von HS02-52G in verschiedenen Verdünnungen, Darstellung von Mittelwerten

Wie zu erwarten nahm der Einfluss des Aptameres auf die Halbwertszeit des APC und die Komplexbildung mit PCI mit steigender Verdünnung ab.

4.4 Einfluss von Protein S auf die Halbwertszeit von rAPC

Da Protein S ein wichtiger Cofaktor für die APC-induzierte Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa ist, sollte sein Einfluss auf die Halbwertszeit von APC untersucht werden. Die Frage war hierbei, ob eine hohe Protein S Konzentration im Plasma die Halbwertszeit von APC eventuell verlängert. Für diesen Versuchsansatz wurde lyophilisiertes Protein S Mangelplasma mit humanem Protein S angereichert. Die finalen Protein S Konzentrationen betragen anschließend

0 nM 20 nM 50 nM 100 nM 150 nM 300 nM,

wobei die Werte zwischen 150 nM und 300 nM im physiologischen Bereich lagen (Rezende et al , 2004).

Konz. PS	HWZ APC
0 nM	44,4
20 nM	62,2
50 nM	53,3
100 nM	52,9
150 nM	43,5
300 nM	39,7

Tabelle 6: HWZ in Minuten von rAPC unter dem Einfluss von Protein S in verschiedenen Konzentrationen, Messung mittels Enzyme-Capture-Assay.

Wie in Tabelle 6 und Abbildung 33 zu erkennen ist, kann hier auf keinen ersichtlichen Zusammenhang zwischen der Protein S-Konzentration und der HWZ von APC geschlossen werden. Schon ohne Zugabe von Protein S ist die HWZ im Mangelplasma ungewöhnlich hoch. Auch unter Zugabe von steigenden Protein S-Konzentrationen zeigt sie keinen stetigen Anstieg oder Abfall.

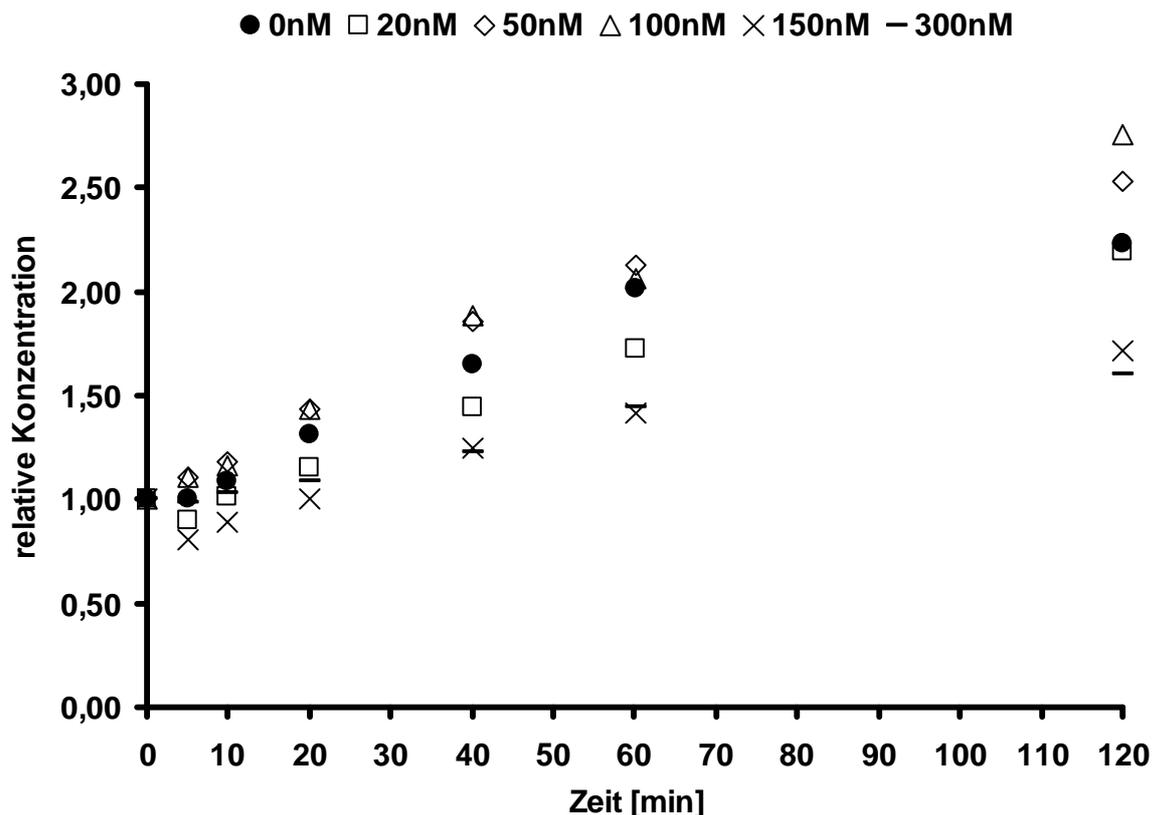


Abb. 33: APC-PCI-Komplex-ELISA, Einfluss von Protein S in verschiedenen Konzentrationen auf die APC-PCI-Komplexbildung, Darstellung der relativen APC-Konzentration

Da für diesen Versuch lyophilisiertes Protein S Mangelplasma verwendet wurde, bestand die Vermutung, dass einer der Vorgänge der Herstellung des Mangelplasmas oder der Lyophilisation und anschließenden erneuten Anlösung die Halbwertszeit des APC beeinflusst. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde im nächsten Versuch die Halbwertszeit von rAPC in verschiedenen Patientenproben, bei denen ein Protein S Mangel bestimmt wurde, gemessen, sowie die Halbwertszeit in Protein S Mangelplasma, normalem und lyophilisiertem Poolplasma bestimmt. Die Protein S-Konzentrationen der Patientenplasmen betragen dabei

13 % 37 % 50 % 95 % >120 %

Wie in Tabelle 6 erkennbar, unterscheidet sich das bisher verwendete normale Poolplasma in der HWZ von rAPC nicht von dem lyophilisierten, während das Mangelplasma (MP) wieder eine extrem hohe rAPC-HWZ aufweist. Unter den Messungen der Patientenplasmen lässt sich keine Korrelation zwischen der Protein S-Konzentration und der rAPC-HWZ oder rAPC-PCI-Komplexbildung nachweisen (Abb. 32).

Plasma	Pool	Lyo Pool	MP	13 %	37 %	50 %	95 %	>120 %
HWZ	24,5	24,6	52,4	16,9	15,1	18,8	16,6	17,2

Tabelle 7: HWZ von rAPC in Minuten, Messung mittels Enzyme-Capture-Assay.

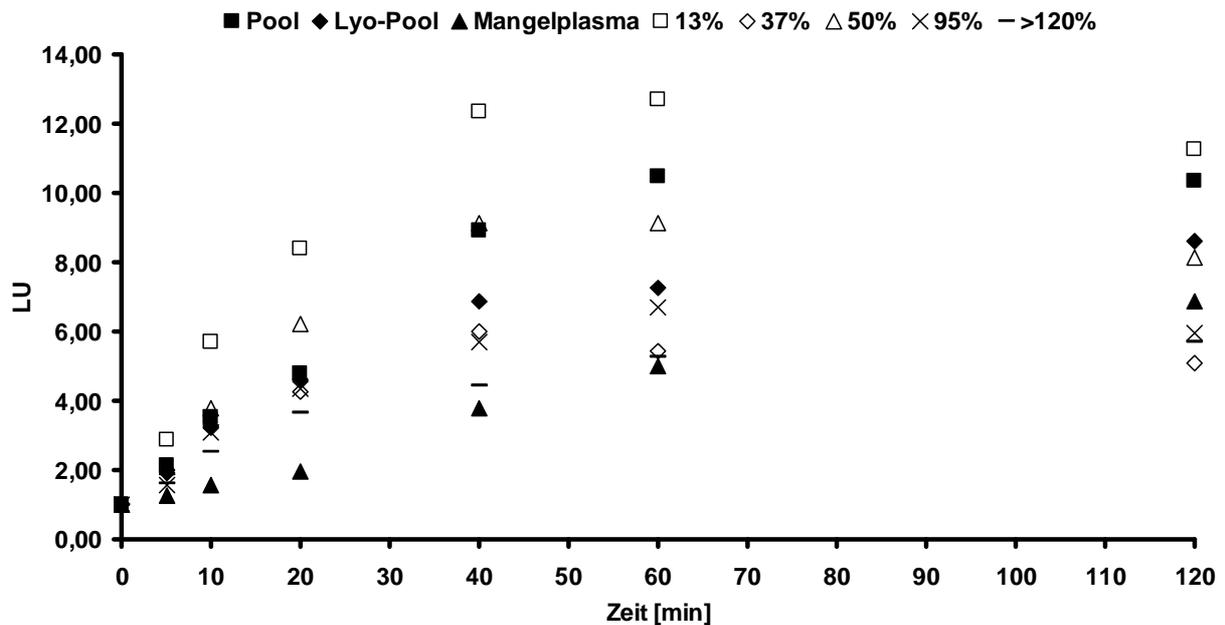


Abb. 34: APC-PCI-Komplex-ELISA, Darstellung von Mittelwerten

Um sicher zu gehen, dass das verwendete Protein S Mangelplasma keine außergewöhnlich niedrigen PCI Konzentrationen enthielt und die Messung dadurch beeinflusst wurde, wurde die PCI Konzentration sowohl in dem Protein S Mangelplasma, als auch in dem von gesunden Mitarbeitern des Institutes hergestellten „Mitarbeiterpool“ gemessen. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit dem PCI-Antikörper (Goat anti PCI affinity purified IgG) beschichtet und das „normale“ Poolplasma in den Verdünnungen 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 jeweils in Doppelwerten in die Wells pipettiert. Für die Verdünnung wurde hier ein PBS-Puffer mit $MgCl_2$ verwendet (1 x PBS – 1 mM $MgCl_2$ – 0,1 % BSA). In jeweils 4 weitere Wells wurde 1:250 in PBS-Puffer verdünntes Protein S Mangelplasma und Mitarbeiterpool pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT und dreimaligem maschinellen Waschen mit PBS-Waschpuffer wurde ein HRP markierter PCI-Antikörper (Goat anti PCI HRP) zu den Wells gegeben, erneut inkubiert, gewaschen und anschließend Substrat (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)) hinzugefügt. Die Ergebnisse des „normalen“ Pools dienten hierbei als Ausgangswerte für die Berechnung der PCI-Konzentrationen im Protein S Mangelplasma und Mitarbeiterpool, welche sich mit 120,8 % PCI im Mangelplasma und 140,7 % im Mitarbeiterpool im Vergleich zum „normalen“ Poolplasma nicht herausragend unterschieden.

Der vorherige Versuch wurde mit anderen Patientenplasmen noch einmal wiederholt und der Pool zur Kontrolle mitgeführt. Die im Poolplasma ermittelte Protein S-Konzentration lag bei 104 %, die der Patienten bei

48,1 % 39,3 % 29,6 % 25,1 % 15 % 13 % 10 %

Weiterhin wurde die Thrombinzeit der Patientenplasmen ermittelt um herauszufinden, ob eine eventuelle Heparinisierung der Patienten die Halbwertszeit des APC beeinflussen könnte. Die ermittelten Thrombinzeiten lagen bis auf die Probe mit einer Protein-S-Aktivität von 39,3 % bei allen Patienten im Normbereich.

% PS	104	48,1	39,3	29,6	25,1	15	13	10
HWZ	18,68	16,11	6,86	17,89	21,52	12,79	16,44	12,81

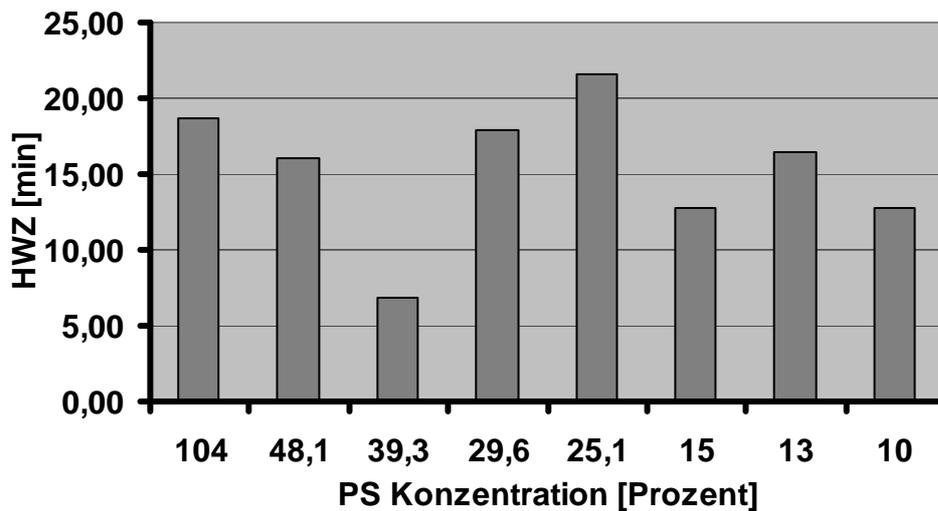


Tabelle 8 und Abb. 35: Messung mittels Enzyme-Capture-Assay und Berechnung der APC-HWZ in Minuten, Darstellung verschiedener Patientenplasmen

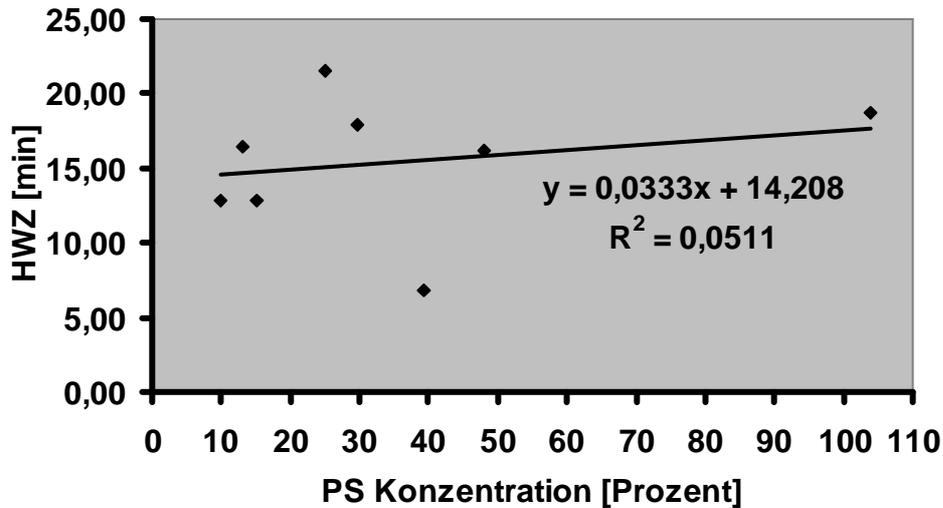


Abb. 36: Messung mittels Enzyme-Capture-Assay und Berechnung der APC-HWZ in Minuten, Darstellung von Einzelwerten

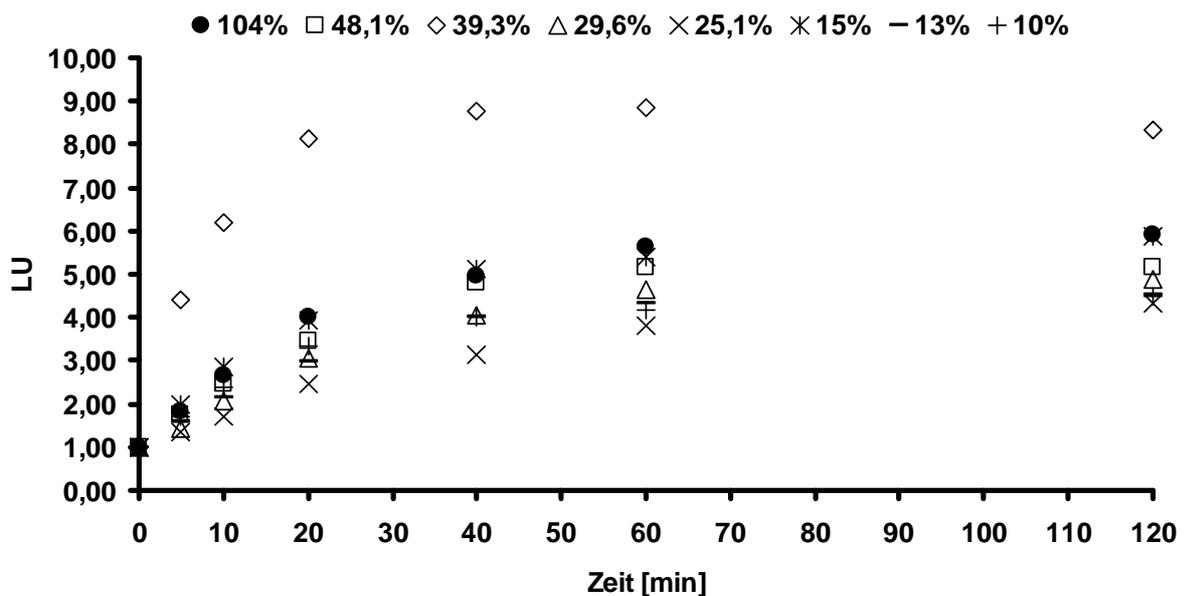


Abb. 37: APC-PCI-Komplex-ELISA, Verwendung verschiedener Patientenplasmen, Darstellung von Mittelwerten

Wie zu erwarten zeigte sich die APC-HWZ des heparinisierten Patientenplasmas (39,3 %) stark herabgesetzt, bzw. eine erhöhte APC-PCI-Komplexbildung (siehe Abb. 35, 37). Allerdings lässt sich bei den Daten wie im vorherigen Versuch kein Zusammenhang zwischen der Protein S-Konzentration und der APC-Halbwertszeit, bzw. der Komplexbildung mit PCI feststellen.

Da in dem Patientenplasma noch andere Faktoren die APC-HWZ beeinflussen könnten und somit keine vergleichbaren Bedingungen unter den Patienten hergestellt werden konnten, wurde eine Probe mit einer 10 %igen Protein S-Konzentration gewählt und diese erneut mit Protein S aufgesättigt. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 0 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 150 nM, 300 nM, wobei 0 nM dem Patientenplasma ohne Hinzufügen von Protein S entspricht.

Pool	0 nM	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM	150 nM	300 nM
19,10	17,08	17,25	15,97	18,09	16,03	10,81	13,95

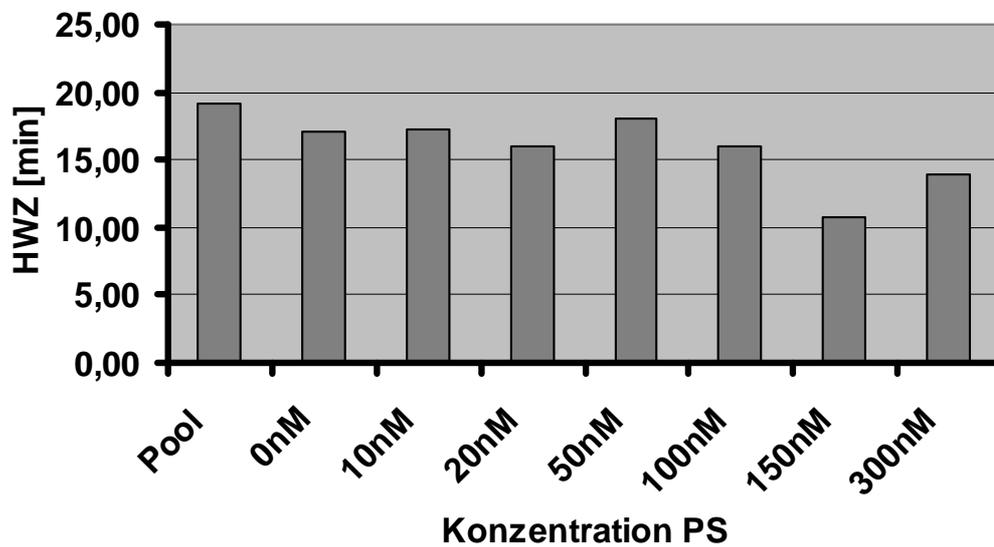


Tabelle 9, Abb. 38: Messung mittels Enzyme-Capture-Assay und Berechnung der APC-HWZ in Minuten unter dem Einfluss von Protein S.

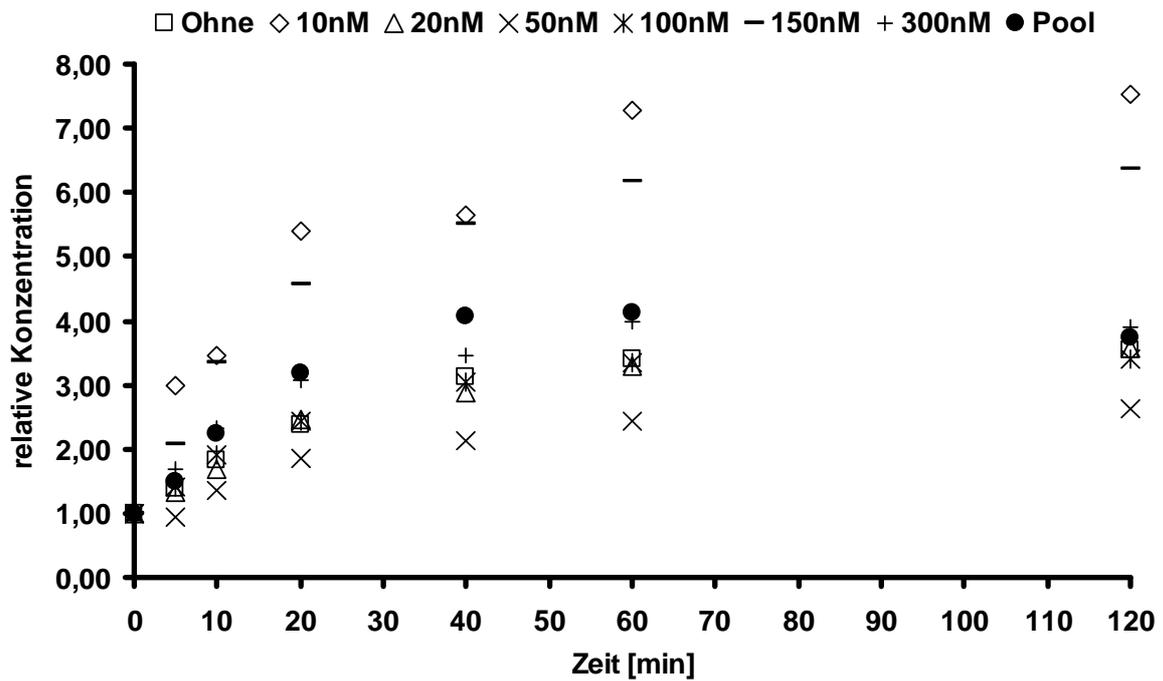


Abb. 39: APC-PCI-Komplex-ELISA unter dem Einfluss von Protein S, Darstellung von Mittelwerten

Wie in Tabelle 9, sowie den Abbildungen 38 und 39 erkennbar, ließ sich erneut kein Zusammenhang zwischen den Protein S-Konzentrationen und der APC-HWZ, bzw. den APC-PCI-Komplexen ermitteln.

5. Diskussion

5.1 Vergleich von pAPC und rAPC

Um Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von APC zu erlangen, sind in den letzten Jahren viele Experimente diesbezüglich durchgeführt worden. Dabei wurden in den verschiedenen Versuchen unterschiedliche Materialien benutzt. So wurden beispielsweise von Hanson et al. in 1989 die antithrombotischen Eigenschaften von humanem PC in vivo untersucht (Hanson et al., 1989). Die Herstellung von PC erfolgte hierbei durch eine Immunaффinitätssäulenchromatographie, durch welche PC aus einem Faktor IX Konzentrat aufgereinigt wurde. Müller et al., 2009a verwendeten in ihrer Arbeit über ssDNA-Aptamere unter anderem das plasmabasierte humane PC Konzentrat Ceprotin[®], welches für die Behandlung eines kongenitalen PC Mangels eingesetzt wird.

In vielen Versuchen über die zytoprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften von APC wurde hingegen mit der rekombinanten Form (Drotecogin α , Xigris[®]) gearbeitet (Aoki et al., 2000; De Backer et al., 2006; Isobe et al., 2001; Müller et al., 2012; Taylor et al., 2000).

Da sich Drotecogin α nur durch einzelne Oligosaccharide im Kohlenhydratteil des Moleküls von dem in natürlicher Weise im Blutplasma vorkommenden APC unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, dass die Erkenntnisse von pAPC auf rAPC übertragbar sind. Jedoch wurden die beiden Formen des Proteins bisher in noch keinem Test direkt miteinander verglichen. Ein (klinischer) Test zur Inhibitionskinetik von APC sollte also sowohl pAPC als auch Xigris[®] (rAPC) erfassen können, was durch die hier verwendeten Testverfahren gewährleistet ist. Wie in den Abbildungen 11-14 zu erkennen ist, lässt sich die Inhibitionskinetik und Komplexbildung mit PCI sowohl von pAPC als auch von rAPC mit dem Enzyme-Capture-Assay, dem APC-PCI-Komplex-ELISA und dem Captured-Enzyme-Assay zuverlässig darstellen.

5.1.2 Bestimmung der Plasma-Halbwertszeiten von pAPC und rAPC

Wie schon von Müller et al., 2009 beschrieben, gab es bisher keine angemessenen Methoden, um APC-Plasmalevel unter praktischen labortechnischen Bedingungen zu

messen. Zwar beschrieben Gruber und Griffin schon 1992 die Verwendung eines Enzyme-Capture-Assays (ECA), allerdings benutzten sie hier als Catcher einen monoklonalen Antikörper, welcher die leichte Kette von PC erkannte. Da der Antikörper jedoch nicht zwischen APC und PC unterscheiden kann und die PC-Konzentration im Plasma um ein vielfaches höher ist als die von APC, mussten die Proben extensiv verdünnt werden um zu gewährleisten, dass nicht alle Bindungsstellen von PC blockiert wurden. Als Konsequenz der sehr geringen gebundenen APC-Konzentrationen musste das für die Quantifizierung verwendete chromogene Substrat über mehrere Wochen inkubieren, um ein ausreichend starkes Signal für die Mengenbestimmung des APC zu generieren (Griffin et al., 1992). Durch die Bindung des Catcher-Antikörpers an hoch kapazitive Agaroseperlen konnte die Inkubationszeit des Substrates auf 16-18h gesenkt werden (Orthner et al., 1993). Liaw et al. berichteten 2003 über die Herstellung des monoklonalen Antikörpers HAPC 1555, welcher eine 10-fach höhere Bindungsneigung an APC als PC aufwies (Esmon et al., 2011; Liaw et al., 2003).

Allerdings war auch mit diesem neuen Antikörper eine Inkubationszeit des verwendeten chromogenen Substrates für mindestens 19 h notwendig, um APC-Konzentrationen unterhalb des Nanogrammbereiches mit einem plattenbasierten Assay zu messen, wodurch der Test immer noch nicht für einen Routineeinsatz geeignet war (Liaw et al., 2003).

Ein alternativer Ansatz um APC nachzuweisen lag darin, die Konzentration an zirkulierenden APC-PCI-Komplexen zu ermitteln. Stenflo et al. entwickelten hierfür einen auf einem monoklonalen Antikörper (M36) basierenden Assay, welcher Neoepitope auf dissoziiertem und an PCI gebundenem APC erkannte (Strandberg et al., 2001; Strandberg et al., 2003). Plasmalevel der APC-PCI-Komplexe spiegeln jedoch die des freien APC nur zu einem gewissen Umfang wieder (Schulman et al., 2009). So ist beispielsweise noch unklar, wie veränderte PCI-Level die Formationskinetik von APC-PCI-Komplexen in vivo beeinflussen. Weiterhin könnten Veränderungen in der Eliminierungsrate der APC-PCI-Komplexe zu einer Über- oder Unterschätzung der zugrunde liegenden APC-Level führen. Außerdem gibt es neben PCI, welches als der hauptsächliche physiologische Inhibitor von APC gilt (Esmon, 2003; Rezaie, 2010), auch Komplexbildungen zwischen APC und Alpha-1-Antitrypsin oder Alpha-2-Makroglobulin,

welche ebenso eine wichtige Rolle unter verschiedenen pathologischen Umständen spielen (Alcaraz et al., 1995; España et al., 1990).

Ein weiterer Versuch, die APC-Konzentrationen zu bestimmen bestand daraus, Blut in zwei separaten Röhrchen abzunehmen, welche entweder Heparin enthielten, um die APC-PCI-Komplexbildung zu verstärken, oder Benzamidin, um die Komplexbildung zu inhibieren. Die zirkulierenden APC-Konzentrationen wurden nun aus der Differenz der Konzentrationen an APC-PCI-Komplexen in den beiden Proben bestimmt (España et al., 2001). Dieser Ansatz erfordert zwangsläufig Multi-Well-Analysen, eine genaue Beobachtung der durch Heparin getriggerten Effekte und hängt außerdem von den Plasmaleveln des PCI ab. Somit bleibt die direkte Messung der Enzym Plasmaleveln erstrebenswert, um den Einfluss von APC auf Gesundheit und Krankheit besser einschätzen zu können.

Für die Verbesserung der APC-Messung wird ein Ligand benötigt, der APC spezifischer bindet. Müller et al. benutzten hierfür das ssDNA Aptamer HS02 52G 3'Bio, welches APC mit hoher Affinität und Spezifität bindet (Müller et al., 2009a; Müller et al., 2012). Dieses Aptamer wurde für die Entwicklung eines OECA (Oligonucleotid Enzym Capture Assay) verwendet, welcher eine schnelle Messung von APC-Plasmaleveln unter klinischen Routinebedingungen gewährleistet. Diese Testmethode wurde hier aufgegriffen, um einen sicheren und schnellen Nachweis von rAPC und pAPC zu gewährleisten. Die von Müller et al. 2012 beschriebene APC-HWZ von ~15-20 Minuten konnte hier bestätigt werden, was die Reproduzierbarkeit dieses Tests unterstützt. Auch in anderen Quellen wird die Halbwertszeit mit 20-25 Minuten (Heeb et al., 1988; Heeb et al., 1991) oder durchschnittlich 22 Minuten (Okajima et al., 1990) beschrieben.

Die HWZ lag im Durchschnitt in den durchgeführten Versuchen bei 22 ± 4 min für rAPC und 21 ± 2 min für pAPC, womit die oben beschriebene Halbwertszeit bestätigt wird. Weiterhin ist erkennbar, dass sich die HWZ von rAPC und pAPC nicht signifikant unterscheidet. Diese Feststellung wird dadurch bestätigt, dass auch im Captured-Enzyme-Assay die Kurven der Inhibitionskinetik von rAPC und pAPC nahezu identisch verlaufen.

5.1.2 Komplexbildung von rAPC und pAPC mit PCI

Da PCI als der hauptsächliche physiologische Inhibitor von APC gilt (Esmon, 2003; Rezaie, 2010), wurde seine Komplexbildung mit pAPC und rAPC verglichen, um auch hier eventuelle Unterschiede herauszuarbeiten. Unter Verwendung des APC-PCI-Komplex-ELISA zeigte sich dabei, dass es zu einer geringfügig höheren Komplexbildung des PCI mit rAPC kam. Wie schon von Müller et al beschrieben, könnte dies an der höheren Reinheit des rekombinanten Moleküls, sowie an seinem anderem Glykosylierungsmuster liegen (Müller et al., 2012), wodurch das PCI oder zur Detektion verwendete Antikörper bessere Bindungsvoraussetzungen haben könnten. Wird das APC dagegen wie beim Captured-Enzyme-Assay an der Platte immobilisiert, zeigt sich kein Unterschied in den Kurvenverläufen der Komplexbildung von rAPC und pAPC mit PCI, was vermuten lässt, dass die hier schon bestehende Bindung des rekombinanten Moleküls an den Catcher die besseren Bindungsvoraussetzungen für PCI relativiert.

5.2 Einfluss verschiedener Heparine auf die APC-Halbwertszeit

Die Assoziation von PCI-Spiegeln mit bestimmten thrombotischen Ereignissen (Carroll et al., 1997; Meijers et al., 2002) und die Feststellung, dass die Konzentration der APC-PCI-Komplexe ein sensibler Indikator für das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung darstellt (Kolbel et al., 2006), verdeutlicht, dass die hauptsächliche physiologische Rolle von PCI in der Zirkulation die Inhibition von APC ist. Interessanter Weise ist die Inhibitionsrate von APC durch PCI mit $1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ recht langsam, sodass man erwarten würde, andere Inhibitoren von APC wie α_1 -Antitrypsin könnten einen größeren Einfluss ausüben (van der Meer et al., 1989). Die Tatsache, dass die APC-PCI-Komplexe ein Marker thrombotische Ereignisse sind, suggeriert, dass PCI trotz seiner niedrigen Inhibitionsrate der hauptsächliche physiologische Inhibitor von APC darstellt. Dies liegt vor allem an den GAG Cofaktoren wie Heparansulfat, welches in den Plasmamembranen vorkommt. Sowohl APC als auch PCI binden an GAGs und die Anwesenheit von Heparin in vivo beschleunigt die maximale Inhibitionsrate von APC durch PCI über 2000-fach (Yang et al., 2002). Somit spielt der Einfluss von Heparin auf die Inaktivierung von APC durch PCI eine wichtige Rolle in der Hämostase.

Als Katalysator der Inhibition von Proteinasen wird Heparin zum Gegenstand vieler Studien, da es gerade als therapeutisches Antikoagulans einen sehr breiten Einsatz findet. Die Eigenschaft von Heparin, die Inhibition von APC durch PCI zu beschleunigen und damit die Gerinnung zu begünstigen, steht im Gegensatz zu dem antikoagulatorischen Effekt der Heparintherapie. Die Assoziationsrate von APC mit PCI zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Heparinkonzentration: Ein Heparin-Molekül bindet sowohl die Protease als auch das Serpin, wodurch die effektive Konzentration der beiden Proteine und somit auch ihre Interaktion erhöht wird. Wird die Heparinkonzentration jedoch über einen bestimmten Level angehoben, neigen die Protease und das Serpin eher dazu, an unterschiedliche Heparine zu binden und der Beschleunigungsgrad der Assoziationsrate fällt wieder (Hermans et al., 1993).

5.2.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin (UFH, Liquemin[®])

Hermans et al. beschrieben 1993 den Einfluss von UFH auf die Inhibition von APC. Hier zeigte sich eine 18-fache Erhöhung der Assoziationsrate von APC mit PCI unter dem Einfluss von 8 μM Heparin, wobei die Messung jedoch nicht im Plasma, sondern in einem Natrium-Phosphat-Puffer erfolgte (Hermans et al., 1993). Auch Pratts et al. beschrieben einen Einfluss von UFH auf PCI, allerdings wurden auch diese Versuche in Pufferlösung durchgeführt (Pratts et al., 1992b). Weiterhin wurde zwar ein Einfluss auf PCI, beziehungsweise die Komplexbildung von APC mit PCI unter dem Einfluss von UFH Heparin beschrieben, jedoch erfolgte keine Messung der APC-HWZ.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss von Heparin erstmalig in einer physiologischen Matrix dargestellt. Wie auch schon vorgehend beschrieben, ließ sich hier eine Zunahme der APC-PCI-Komplexe unter Zugabe von UFH in beiden Testverfahren nachweisen (siehe Abb. 16 und 18). Dabei zeigte sich wie erwartet ein deutlicher Unterschied zwischen den zugeführten Liquemin[®]-Konzentrationen, wobei die geringste Konzentration von 0,1 U/ml keinen nennenswerten Einfluss erbrachte. Während die Kurven für pAPC und rAPC in dem Captured-Enzyme-Assay nahezu identisch verlaufen, lässt sich wie oben bereits beschrieben in dem APC-PCI-Komplex-ELISA eine stärkere Beeinflussung des Komplexaufbaus unter der Verwendung von rAPC nachweisen (Abb. 16). Erst bei sehr hohen Liquemin[®]-Konzentrationen von 10

U/ml lässt sich auch in dem Captured-Enzyme-Assay ein minimaler Unterschied zwischen der Komplexbildung von rAPC und pAPC mit PCI erkennen (Abb. 18). Es wäre denkbar, dass Liquemin[®] in dem Captured-Enzyme-Assay keine optimalen Bindungsvoraussetzungen hat, da das APC schon an der Platte immobilisiert ist, während die Komplexbildung mit APC in dem APC-PCI-Komplex-ELISA uneingeschränkt frei im Plasma verlaufen kann.

Die mittels des Enzyme-Capture-Assays gemessene HWZ der beiden Enzym-Varianten unterstützt die Ergebnisse der Komplexbildung: Die Halbwertszeit nimmt sowohl von rAPC als auch von pAPC mit steigender Liquemin[®]-Konzentration deutlich ab. Dabei ist auch hier ein dezenter Unterschied zwischen rAPC und pAPC erkennbar; die HWZ von rAPC liegt im Durchschnitt 2,33 Minuten unter der von pAPC (siehe Tabelle 3). Ist APC dagegen an der Platte immobilisiert, verlaufen die Kurven der Inhibitionskinetik beider Proteine wieder näher beieinander, sodass kein eindeutiger Unterschied des Einflusses von Liquemin[®] auf eine der beiden APC-Formen nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 17). Auch hier könnte der vorstehend genannte Effekt aufgrund der Immobilisierung eine Rolle spielen.

5.2.2 Einfluss verschiedener Heparine mit unterschiedlichen Molekulargewichten

Pratts et al. verglichen unter anderem den Einfluss von UFH und NMH auf die Inhibition von APC durch PCI (Pratts et al., 1992a), mit der Erkenntnis, dass beide Heparine die Inhibition beschleunigen. Dabei fand unter Verwendung von UFH eine Steigerung der Inhibitionsrate um das 52,2-fache statt, unter Verwendung von NMH nur eine Steigerung um das 12,1-fache. Allerdings wurden auch hier die Versuche in einer Puffer-Lösung durchgeführt und nicht in Plasma. Ein Vergleich verschiedener Heparine als Einflussfaktor auf die HWZ von APC fehlt bislang ebenfalls.

Der zuerst erfolgte Vergleich des Einflusses verschiedener Heparine auf die Inhibition von rAPC durch PCI mittels des APC-PCI-Komplex-ELISA konnte den deutlich stärkeren Einfluss von UFH im Gegensatz zu NMH auf die Komplexbildung mit PCI nicht in diesem Maß bestätigen. Bei Zugabe von 0,1 U/ml UFH zeigte sich zwar ebenfalls eine stärkere Komplexbildung von APC mit PCI als bei Zugabe von 0,1 U/ml NMH (Abb. 19), allerdings ist diese im Plasma nicht so ausgeprägt, wie vorhergehend in Pufferlösung

beschrieben. Bei einer Steigerung der Heparinkonzentration auf 1 U/ml verliert sich dieser Unterschied zunächst (siehe Abb. 20). Hier erfolgt eine leichtgradig verstärkte Komplexbildung der beiden Enzyme mit PCI unter dem Einfluss von NMH. Interessanter Weise lässt sich der bei 0,1 U/ml gezeigte Effekt bei einer weiteren Dosissteigerung auf 10 U/ml reproduzieren, auch hier zeigt sich unter dem Einfluss von UFH eine höhere Komplexbildung als unter dem Einfluss von NMH, wobei die Sättigungsgrenze schon nach 20 Minuten erreicht wird (siehe Abb. 21). Die beiden verwendeten NMH (Enoxaparin-Natrium (Clexane[®]) und Nadroparin-Kalzium (Fraxiparin[®])) zeigen in allen drei verwendeten Konzentrationen einen annähernd identischen Kurvenverlauf der Bildung von APC-PCI-Komplexen, wodurch unter anderem auch die Zuverlässigkeit des APC-PCI-Komplex-ELISA unterstrichen wird.

Danaparoid-Natrium (Orgaran[®]) zeigt wie zu erwarten in den Konzentrationen von 0,1 U/ml einen geringeren Einfluss auf die APC-PCI-Komplexbildung als das UFH und NMH, jedoch lässt sich bei einer Konzentration von 1 U/ml kein signifikanter Unterschied zu den UFH und NMH nachweisen. Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung auf 10 U/ml verläuft die Kurve der APC-PCI-Komplexbildung gerade innerhalb der ersten 20 Minuten wieder unterhalb derer der UFH und NMH, die Sättigungsgrenze wird hier nicht so schnell erreicht wie bei den anderen drei Heparinen (siehe Abb. 19-21). Diese Beobachtung deckt sich mit der Erkenntnis von Li et al., dass der Einfluss von Heparin auf die Bildung der APC-PCI-Komplexe steigt, je höher das Molekulargewicht des Heparins ist (Li et al., 2008). Hierzu passen auch die Ergebnisse der Komplexbildung unter Zugabe von Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]): Dieses synthetisch hergestellte Pentasaccharid mit einer sehr geringen Molekülmasse (M_r 1.728) zeigte zwar bei einer Konzentration von 0,1 U/ml noch einen ähnlichen Einfluss auf den Komplexaufbau von APC mit PCI wie Danaparoid-Natrium (siehe Abb. 19). Steigert man jedoch die Konzentration auf 1 U/ml oder sogar 10 U/ml zeigt sich keine wesentliche Steigerung der Komplexbildung im Vergleich zu den Ansätzen ohne Heparin (siehe Abb. 20 und 21). Die Beschleunigung der Komplexbildung zwischen APC und PCI wird hauptsächlich durch die negative Ladung der Heparine katalysiert. Je kürzer das verwendete Heparin, desto geringer wird die negative Ladung, sodass sich bei den kürzeren Molekülen ein geringerer Einfluss auf die Komplexbildung zeigt. Da Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]) nur dem Antithrombin-bindenden Teil der Heparinmoleküle mit lediglich einer

zusätzlichen Methylgruppe am reduzierten Ende entspricht, ist seine Wirkung auf die APC-PCI-Komplexbildung wie erwartet am geringsten.

Diese Ergebnisse lassen sich auch in der HWZ von rAPC nachweisen: Unter Zugabe von steigenden Konzentrationen des UFH sinkt die HWZ von rAPC am stärksten ab, gefolgt von der unter NMH. Unter Zugabe von Danaparoid-Natrium sinkt die rAPC HWZ erst bei einer Zugabe von 10 U/ml signifikant, während auch hohe Konzentrationen von Fondaparinux-Natrium keinen Einfluss auf die HZW zeigen (Tabelle 4).

Unter Zugabe von 0,1 U/ml des UFH zeigt sich wider Erwarten eine längere APC-HWZ als unter Zugabe von NMH, Danaparoid-Natrium oder Fondaparinux-Natrium. Da Heparine auch an Plasmaproteine binden können, könnte diese Beobachtung auf unterschiedlich ausgeprägte Assoziationen der Heparine mit Plasmaproteinen hinweisen, welche die Reproduzierbarkeit bei Anwendung niedriger Heparin-Plasmakonzentrationen senkt.

5.2.3 Direkter Vergleich des Einflusses verschiedener Heparine

Nach den bisher gefundenen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Heparine einen unterschiedlichen Einfluss auf die Plasma-Halbwertszeit von pAPC und rAPC haben. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde die HWZ von APC und seine Komplexbildung mit PCI erneut für beide Enzyme mittels des Enzyme-Capture-Assays und des APC-PCI-Komplex-ELISA bestimmt. Da die Proben unter den selben Bedingungen hergestellt wurden, um einen möglichst optimalen Vergleich zu gewährleisten, wurde hier lediglich UFH, eines der NMH und Fondaparinux-Natrium (Arixtra®) in einer Konzentration von je 1 U/ml zu den Proben gegeben, da eine zeitgleiche Herstellung noch zusätzlicher Proben nicht durchführbar gewesen wäre.

Wie auch schon unter dem oben beschriebenen Einfluss von UFH zeigt sich wiederum eine leicht längere HWZ (durchschnittlich 1,3 min) des pAPC bei Zugabe der verschiedenen Heparine. Auch die Feststellung, dass Fondaparinux-Natrium die HWZ von rAPC am geringsten beeinflusst, lässt sich auf pAPC übertragen (siehe Tabelle 5).

Die Ergebnisse des mit UFH durchgeführten APC-PCI-Komplex-ELISA lassen sich hier ebenfalls reproduzieren: Es zeigt sich wieder ein stärkerer Aufbau der APC-PCI-Komplexe bei Zugabe des UFH zu rAPC (Abb. 22). Auch das NMH führt zu einer

höheren Komplexbildungsrate von rAPC als bei pAPC, während Fondaparinux-Natrium das rAPC verhältnismäßig wenig beeinflusst. Hier verläuft die Kurve im Bereich der Komplexbildung von pAPC mit PCI unter dem Einfluss von UFH und NMH, welche deutlich unterhalb ihrer beiden Vergleichskurven mit rAPC liegen. Jedoch lässt sich auch bei Fondaparinux-Natrium ein Unterschied zwischen der Zugabe zu rAPC und pAPC erkennen, es bilden sich hier wieder erkennbar weniger pAPC-PCI-Komplexe als unter Zugabe des UFH und NMH zu pAPC.

Um einen direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Heparinkonzentrationen (0,1 U/ml, 1 U/ml, 10 U/ml) zu gewährleisten, wurden die HWZ und Komplexbildung von rAPC und pAPC mittels des Captured-Enzyme-Assays festgehalten, bei dem sich einfacher viele Konzentrationen gleichzeitig darstellen lassen. Wie schon vorgehend unter dem Einfluss des UFH beschrieben, lässt sich auch hier kein bedeutender Unterschied zwischen dem rAPC und pAPC erkennen. Wie durch die vorhergehenden Ergebnisse zu erwarten, zeigte sich eine Abflachung der Inhibitionskinetik-Kurven bei steigenden Konzentrationen des UFH und NMH (Abb. 23 und 24), während Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]) die Kurven der Inhibitionskinetik beider Enzyme so marginal beeinflusste, dass kein nennenswerter Unterschied erkennbar war (siehe Abb. 25).

Die Ergebnisse der APC-PCI-Komplexbildung erwecken den Anschein, durch die steigende Heparinkonzentrationen stärker beeinflusst zu werden als die APC-HWZ. Da die Testsysteme zur Messung der APC-HWZ und Komplexbildung mit PCI aufgrund der unterschiedlichen Methodiken nicht direkt miteinander vergleichbar sind, kann ein solcher Effekt, zumindest auf Basis der vorliegenden Daten allerdings nicht bestätigt werden.

Sowohl unter Zugabe von 10 U/ml UFH als auch NMH zeigt sich eine enorme Steigerung der rAPC- und pAPC-Komplexbildung mit PCI (siehe Abb. 26 und 27). Wie schon deutlich in dem APC-PCI-Komplex-ELISA zu sehen, zeichnet sich hier eine leicht stärkere Komplexbildung des rAPC mit PCI ab, welche aber im Gegensatz zu dem anderen Testverfahren aufgrund der oben beschriebenen Vermutung deutlich geringer ausfällt.

Im Gegensatz zu dem UFH und NMH zeigt selbst die Zugabe von hohen Konzentrationen des Fondaparinux-Natrium einen verhältnismäßig geringen Einfluss auf die APC-PCI-Komplexbildung (siehe Abb. 28). Zwar steigt auch diese bei Zugabe von 10 U/ml an, jedoch nicht so stark wie bei den anderen beiden Heparinen, was sich mit den vorstehend beschriebenen Ergebnissen deckt.

Die hier gezeigte Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zeigt deutlich, wie zuverlässig sich auch die Einflüsse verschiedener Heparinkonzentrationen mit den verwendeten Testmethoden darstellen lassen.

5.3 Klinische Relevanz des Einflusses von Heparinen auf die APC-Halbwertszeit

Die HWZ von APC ist besonders für intensivmedizinisch betreute septische Patienten wichtig, da hier das APC-System auf nahezu allen Ebenen eingeschränkt ist (Eckle et al., 1991; Mesters et al., 2000; Vary et al., 1992). Da Patienten durch die lange Liegezeit während ihres intensivmedizinischen Aufenthaltes ein erhöhtes Thromboserisiko aufweisen, werden sie mit Heparin antikoaguliert. Dabei haben sich UFH und NMH zur Prophylaxe als wirksam erwiesen (Heinzl, 2011) und sollten einen Plasmaspiegel von 0,05-0,25 U/ml für UFH und 0,1-0,3 U/ml für NMH aufweisen (Carl-Thiem-Klinikum Cottbus). In der Therapie eines akuten thrombembolischen Ereignisses liegen die angestrebten Plasmaspiegel mit 0,4-0,8 U/ml für UFH und 0,5-1,0 U/ml für NMH deutlich höher (Carl-Thiem-Klinikum Cottbus). Die gefährlichste unerwünschte Wirkung des Heparins ist die heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT), welche mit paradoxen Gefäßverschlüssen assoziiert ist. Unter einer HIT kommt es zu einem Abfall der Thrombozytenwerte um > 50 % und/oder zu thrombembolischen Komplikationen, welche vor allem zwischen dem 5. und 14. Tag einer Heparintherapie auftreten. UFH führt dabei deutlich häufiger zu einer HIT als NMH (circa 10:1) (Greinacher, 2003). Zur Behandlung von thrombembolischen Erkrankungen bei Patienten mit HIT wird Orgaran® i.v. eingesetzt. Die angestrebten Anti-Xa-Spiegel im Plasma betragen 0,5-0,7 U/ml 5-10 Minuten nach Bolusapplikation, nicht mehr als 1,0 U/ml während der Anpassungsphase und 0,5-0,8 U/ml während der Erhaltungsinfusion (CELLTECH, 2003).

Heparin kann entweder subcutan oder intravenös gegeben werden, jedoch muss es einen Plasmaspiegel von $> 0,2$ U/ml erreichen, um einen optimalen Effekt in der Behandlung einer Thrombose zu erlangen. Niedrigere Dosen werden zur Thromboseprophylaxe verwendet (Careinternet). Der angestrebte therapeutische Bereich in der Behandlung einer Thrombose läge also zwischen den hier durchgeführten Versuchen von 0,1 U/ml und 1 U/ml. Dementsprechend stellen die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse eine wichtige Grundlage für die Bewertung möglicher Nebeneffekte durch eine verstärkte Inhibition von APC durch angewandte Heparine dar.

Ein weiterer Ansatzpunkt für den Einsatz von rAPC wurde 2011 von Borggreffe et al. diskutiert: Patienten mit einer systemischen Gerinnungsaktivierung und normaler Endothelfunktion weisen APC-Level zwischen 50 und 80 ng/ml auf, während es in gesunden Menschen 1 bis 3 ng/ml beträgt (Griffin et al., 1992). Patienten mit einer schweren Sepsis, welche außerdem stark erhöhte Level für D-Dimere und andere Fibrin-assoziierten Marker aufweisen, zeigen dagegen nur APC-Level in einem Bereich von 10 bis 20 ng/ml (Yan et al., 2001). Interessanter Weise ist bei Patienten mit einer akuten Lungenembolie die intravaskuläre Fibrinbildung nicht mit erhöhten Leveln des endogenen APC assoziiert (Dempfle et al., 2011).

Für die Behandlung der akuten tiefen Venenthrombose (TVT) und Lungenembolie wird üblicherweise Enoxaparin (Clexane[®]) als NMH eingesetzt. Dempfle et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von Enoxaparin in der Behandlung einer Lungenembolie zu einer parallelen Reduktion löslichen Fibrins und von Fibrinaubbauprodukte führt, jedoch keinen offensichtlichen fibrinolytischen Effekt mit sich führt. Eine zusätzliche Gabe von DAA (Drotrecogin alfa activated) geht mit einem schnelleren Abfall der fibrinassozierten Marker einher, ohne die Beziehung zwischen den Markern der Fibrinbildung und –auflösung zu ändern. Der fibrinolytische Effekt der bei Lungenembolie eingesetzten Antikoagulanzen, welcher zu einer schnelleren Gerinnungslösung führt, scheint kein systemisches sondern ein lokales Phänomen im Bereich des Thrombus zu sein. Die Blutungsinzidenz war dabei gering und lag in dem erwarteten Bereich einer alleinigen therapeutischen Dosis von Enoxaparin (Dempfle et al., 2011). Weiterhin ereignete sich einer der beiden schweren Blutungsfälle in der Kontrollgruppe, die kein DAA bekommen hatte (Dempfle et al., 2011).

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen eine weitere Einsatzmöglichkeit für rAPC. Seine kurze HWZ in Kombination mit NMH spricht dabei für eine gute Steuerbarkeit in der Behandlung akuter Lungenembolien.

5.4 Einfluss der DNA-Aptamere auf die APC-Halbwertszeit

Die zahlreichen Eigenschaften von APC bedingen Interaktionen mit verschiedenen Plasma- und Zellproteinen. Diese molekularen Wechselwirkungen werden durch Cluster auf der Zelloberfläche des APC kontrolliert, welche von dem aktiven Zentrum entfernt liegen und als Exosites bezeichnet werden (Müller et al., 2009a). Basische Reste dreier oberflächlicher Schlingen bilden die sogenannte basische Exosite, welche in die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa involviert ist (Dahlbäck et al., 2005; Fernández et al., 2007). Eine zweite Exosite, welche von sauren Resten gebildet wird, ist für die Interaktion von APC mit PAR-1 verantwortlich und vermittelt somit dessen zellprotektiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften (Yang et al., 2007).

Aptamere der HS02-Familie greifen wie Heparin spezifisch die basische Exosite von APC an, wodurch die antikoagulatorischen Eigenschaften von APC gehemmt werden (Müller et al., 2009a). Diese Eigenschaft der HS02-Aptamere könnte zu vielversprechenden Vorteilen bei der Behandlung von Hämophilie-Patienten führen, da gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von APC das Fehlen von FVIII teilweise kompensieren kann (Butenas et al., 2006).

Eine unerwünschte Nebenwirkungen in der Behandlung von Sepsispatienten mit rekombinantem APC waren die schweren Blutungen, welche bei 2 % der Patienten auftreten (Levi, 2008). Hier liegt ein weiterer möglicher Einsatzpunkt der Aptamere, welche selektiv die gerinnungshemmenden Eigenschaften von APC blockieren können. Wie Müller et al. beschrieben, kommt es durch die Bindung von HS02-Aptameren an APC zu einer gesteigerten Komplexbildung von APC mit PCI, wobei es eine Korrelation zwischen der Größe des Aptamers und der Inaktivierung von APC durch PCI gibt (Müller et al., 2009a).

Die Erkenntnis, dass die APC-PCI-Komplexbildung mit steigender Aptamergröße beschleunigt wird, konnte in dem Captured-Enzyme-Assay bestätigt werden. Hier zeigte sich wie erwartet eine korrelierende Abnahme der APC-HWZ mit steigender Aptamergröße und ein dazu passender Anstieg der APC-PCI-Komplexe (siehe Abb. 29 und 30). Auch eine Verdünnung des Aptamers HS02-52G zeigte die erwartete Abnahme des Aptamer-Einflusses auf die HWZ von APC und die APC-PCI-Komplexbildung bei steigender Verdünnung (Abb. 31 und 32).

Diese Ergebnisse sprechen wiederum für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten Captured-Enzyme-Assays. Zudem konnte der Einfluss der DNA-Aptamere auf die Plasma-HWZ von APC intensiver analysiert werden. Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse eine wichtige Grundlage zur Bewertung des potentiellen in vivo Einsatzes der anti-APC-Aptamere in den vorstehend beschriebenen Situationen dar.

5.5 Einfluss von Protein S auf die APC-Halbwertszeit

Protein S (PS) verstärkt als Cofaktor von APC die APC-vermittelte Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa (Gandrille et al., 2000). In vivo spielt Protein S eine wichtige Rolle, wie sich bei Kindern mit einem kompletten PS-Mangel zeigt, die an einer Purpura fulminans leiden. Auch heterozygote Träger von PROS1 Gendelektionen und Punktmutationen haben mit schwerwiegenden Risiken wie venösen Thromembolien zu rechnen (Gandrille et al., 2000; Makris et al., 2000). Protein S bindet Phospholipide und hilft APC in der Nähe von FVa und FVIIIa an Membranoberflächen zu binden. Dabei wird die Spaltungsrate von FVa um das 20-fache und die von FVIIIa um das 3-fache erhöht (O'Brien et al., 2000; Rosing et al., 1995). Während die Funktionen der Domänen von PS ausgiebig untersucht wurden, wird die APC-Cofaktor-Funktion von PS auf molekularer Ebene bisher nur dürftig verstanden. Auch gibt es bisher keine Untersuchungen zu dem Einfluss von Protein S auf die HWZ von APC. Aufgrund seiner wichtigen Cofaktor-Funktion liegt die Vermutung nahe, dass Protein S einen verlängernden Einfluss auf die HWZ von APC haben könnte und auch somit zu einer erhöhten Spaltungsrate der Faktoren Va und VIIIa beiträgt. Es könnte beispielsweise

durch eine Bindung von Protein S an APC zu einer Formstabilisierung des APC kommen, indem die Bindungsmöglichkeiten für PCI herabgesetzt werden. In diesem Fall hätte der Protein S-Plasmaspiegel eine klinische Relevanz in Bezug auf die Wirkung von DAA, da somit bei erhöhten PS-Spiegeln ein erhöhtes Blutungsrisiko unter DAA-Applikation bestehen könnte.

Physiologische Plasmawerte für PS zwischen 150 nM und 300 nM würden nach dieser Theorie zu einer normalen APC-HWZ von ~22min führen, während niedrigere Protein S Spiegel eine Verkürzung der APC-HWZ zur Folge hätten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Aufstockung von lyophilisiertem Protein S-Mangelplasma mit Protein S konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen der APC-HWZ und Protein S-Konzentration bestätigen. Wider Erwarten war die HWZ von APC sogar – selbst bei den niedrigsten Protein S Konzentrationen - überdurchschnittlich hoch (Tabelle 6). Auch die APC-PCI-Komplexbildung zeigte keine nachvollziehbare Abhängigkeit von Protein S (Abb. 33). Diese Ergebnisse sind jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach auf die hier verwendete Plasmamatrix zurückzuführen. So wurde zu diesem Zeitpunkt die Lyophilisierung des Protein-S-Mangelplasma aber auch eine mögliche Zugabe etwaiger Stabilisatoren für die gefundenen Werte verantwortlich gemacht.

Die im nächsten Schritt verwendeten Patientenplasmen wurden nach ihrem PS-Gehalt ausgewählt und mit verschiedenen Normalplasmen verglichen. Hier zeigte sich, dass die verlängerte APC-HWZ in Protein S-Mangelplasma nicht am Vorgang der Lyophilisierung liegen konnte, da ein „normales“ lyophilisiertes Plasma die gleiche APC-HWZ aufwies wie ein natives Plasma (Tabelle 7). Jedoch schien in dem verwendeten PS-Mangelplasma tatsächlich ein Zusatzstoff zu sein, welcher die HWZ von APC bis auf das 2-fache verlängert.

Die verwendeten Patientenplasmen zeigten auch in diesem Versuch keinen Einfluss der enthaltenen PS-Konzentrationen auf die jeweils gemessenen APC-HWZ oder die APC-PCI-Komplexbildung (Tabelle 7 und 8, Abb. 34-37). Die ermittelte Thrombinzeit, welche zum Nachweis des Vorliegens von Heparin in den Proben eingesetzt wurde, lag bei 6 von 7 Proben im Normbereich, sodass eine eventuelle Heparinisierung als Einfluss auf die APC-HWZ ausgeschlossen werden konnte. Die Probe, die eine verlängerte

Thrombinzeit (>150 s) aufwies, zeigte erwartungsgemäß die niedrigste APC-HWZ (Tabelle 8, Abb. 35).

Um den Einfluss anderer Faktoren auf APC auszuschließen, wurde in einem erneuten Versuch eine einzelne Patientenprobe mit Protein S aufgestockt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Konzentrationen unter Benutzung der selben Plasmamatrix zu gewährleisten. Wie in den vorherigen Versuchen ließ sich auch hier kein Zusammenhang zwischen der Protein S-Konzentration und der APC-HWZ oder APC-PCI-Komplexbildung nachweisen (Tabelle 9, Abb. 38 und 39), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Protein S zwar die Spaltung der Faktoren Va und VIIIa beschleunigt, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die HWZ von APC aufweist.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Serinprotease APC spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Blutgerinnung und hat zudem zytoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften. Letztere waren Grundlage für die Anwendung von rekombinantem APC bei Sepsis, die jedoch aufgrund der antikoagulatorischen Wirkung von APC mit einem erhöhten Blutungsrisiko einherging. Die therapeutische Breite von rekombinantem APC wird zusätzlich durch die PCI-vermittelte Inaktivierung von APC begrenzt, deren Beschleunigung durch Heparin diskutiert wird. Durch das bei Sepsis-Patienten häufig eingesetzte Heparin könnte somit eine erwünschte APC-Wirkung beeinträchtigt werden. Um durch ein besseres Verständnis der Inaktivierungskinetik von APC die Wirksamkeit und Sicherheit einer therapeutischen Anwendung zu erhöhen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Heparinen auf die Inaktivierungskinetik von APC in der Plasmamatrix untersucht. Hierzu wurden verschiedene Testverfahren entwickelt und eingesetzt, die auf einer Antikörper- oder Aptamer-vermittelten Immobilisierung von APC oder APC-PCI-Komplexen und anschließender Quantifizierung durch Enzym-markierte Antikörper oder proteolytische Spaltung eines fluorogenen Substrates basieren.

Unter Einsatz dieser Testverfahren wurde eine Halbwertszeit von APC im Plasma von ca. 21 Minuten ermittelt, wobei sich zwischen rekombinantem und plasmatischem APC keine signifikanten Unterschiede ergaben. In Anwesenheit therapeutischer Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin und verschiedenen niedermolekularen Heparinen wurde eine Verkürzung der Halbwertszeit von APC auf 15 bis 16 Minuten beobachtet. Im Gegensatz dazu führte das synthetische Heparinoid Fondaparinux zu keiner signifikanten Veränderung der Halbwertszeit von APC in Plasma. Auch die Konzentration des APC-Cofaktors Protein S im Plasma hatte keinen Einfluss auf die Halbwertszeit. Unter Anwesenheit gegen APC gerichteter Aptamere im Plasma wurde jedoch wiederum eine Verkürzung der Halbwertszeit von APC beobachtet.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung des Einflusses von Heparinen auf die Inaktivierungskinetik von APC in der Plasmamatrix. Die Beobachtung, dass Fondaparinux die Halbwertszeit von APC in vitro nicht beeinflusst, könnte neue Therapieoptionen bei der Behandlung von Sepsispatienten eröffnen, die mit einer besseren Wirksamkeit von rekombinantem APC im Vergleich zur Antikoagulation mit

Heparinen verbunden sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte zunächst die Abhängigkeit der in vivo Halbwertszeit von rekombinantem APC von Heparinen und Fondaparinux untersucht werden.

Die Verkürzung der Halbwertszeit von APC durch gegen APC gerichtete Aptamere bietet einen Ansatzpunkt für die bessere Steuerung einer Therapie mit rekombinantem APC, da im Falle von Blutungskomplikationen solche Aptamere zur Antagonisierung der antikoagulatorischen Wirkung von APC eingesetzt werden könnten. Auch in diese Richtung sind weitere klinische Studien erforderlich.

7. Literaturverzeichnis

Alban S, Scriba GKE. Kommentar zur Monographie "Danaparois sodium" PhEur 6.0, 2090. In: Bracher F, Böhme H, Hartke K, Hrsg. Arzneibuch-Kommentar, Bd 5, Monographie D bis H. Stuttgart, Eschborn: Govi-Verlag, 2007: 1-8

Alberio L, Lammle B, Esmon CT. Protein C replacement in severe meningococemia: rationale and clinical experience. Clin Infect Dis 2001; 32: 1338-1346

Alcaraz A, España F, Sánchez-Cuenca J, Zuazu I, Estellés A, Aznar J, Vicente V. Activation of the protein C pathway in acute sepsis. Thromb Res 1995; 79: 83-93

Allen DH, Tracy PB. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. J Biol Chem 1995; 270: 1408-1415

Aoki Y, Ota M, Katsuura Y, Komoriya K, Nakagaki T. Effect of activated human protein C on disseminated intravascular coagulation induced by lipopolysaccharide in rats. Arzneimittelforschung 2000; 50: 809-815

De Backer D, Verdant C, Chierago M, Koch M, Gullo A, Vincent JL. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. Crit Care Med 2006; 34: 1918-1924 doi: 10.1097/01.CCM.0000220498.48773.3C

Bae JS, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. Blood 2007; 110: 3909-3916 doi: 10.1182/blood-2007-06-096651 (a)

Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 2867-2872 doi: 10.1073/pnas.0611493104 (b)

Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 954-961 doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02924.x

Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 959-972

Berezovski M, Drabovich A, Krylova S.M, Musheev M, Okhonin V, Petrov A, Krylov SN. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 3165-3171

Bernard GR, Ely EW, Wright TJ, Fraiz J, Stasek JE, Jr, Russell JA, Mayers I, Rosenfeld BA, Morris PE, Yan SB. Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29: 2051-2059 doi: 10.1097/00003246-200111000-00003 (a)

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 (b)

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67

Bizios R, Lai L, Fenton JW, 2nd, Malik AB. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986; 128: 485-490

Bock C, Coleman M, Collins B, Davis J, Foulds G, Gold L, Greef C, Heil J, Heilig J.S, Hicke B, Hurst M.N, Husar G.M, Miller D, Ostroff R, Petach H, Schneider D, Vant-Hull B, Waugh S, Weiss A, Wilcox S.K, Zichi D. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics* 2004; 4: 609-618

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

Borggrefe M, Dempfle CEH, Elmas E, Janes J, Liebe V, Link A, Suvajac N. Endogenous plasma activated protein C levels and the effect of enoxaparin and drotrecogin alfa (activated) on markers of coagulation activation and fibrinolysis in pulmonary embolism. *Critical Care* 2011; 15: R23 doi:10.1186/cc9968

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

van Boven HH, Lane DA. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol* 1997; 34:188-204

Branson HE, Katz J, Marble R, Griffin JH. Inherited protein C deficiency and coumarinresponsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. *Lancet* 1983; 2: 1165-1168

Briede JJ, Heemskerk JW, van't Veer C, Hemker HC, Lindhout T. Contribution of platelet-derived factor Va to thrombin generation on immobilized collagen- and fibrinogen-adherent platelets. *Thromb Haemost* 2001; 85: 509-513

Brody EN, Willis MC, Smith JD, Jayasena S, Zichi D, Gold L. The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics. *Mol Diagn* 1999; 4: 381-388

Broze GJ, Lange GW, Duffin KL, Macphail L. Heterogeneity of Plasma Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Blood Coagul Fibrinol* 1994; 5: 551-559

Butenas S, Orfeo T, Kalafatis M, Mann KG. Peptidomimetic inhibitors for activated protein C: implications for hemophilia management. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2411-2416

Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1989-1996

Care Clinical Research, 2013: Heparin.

<https://www.careinternet.net/caregiver/heparin.php> (Zugriffsdatum: 27.10.2013)

Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, 2014: Anti-Faktor Xa-Aktivität. <http://www.ctk.de/Anti-Faktor-Xa-Aktivitaet-1015.0.2.html?qu=A> (Zugriffsdatum 27.10.2013)

Carroll VA, Griffiths MR, Geiger M, Merlo C, Furlan M, Lammle B, Binder BR. Plasma protein C inhibitor is elevated in survivors of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 114-118

CELLTECH, Orgaran[®], Fachinformation (zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels)

<http://www.uni->

[duesseldorf.de/WWW/MedFak/KlinChem/Leistungsverzeichnis/Parameter/Fachinfo/Organ.pdf](http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/KlinChem/Leistungsverzeichnis/Parameter/Fachinfo/Organ.pdf)

Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: e72-91

Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Brit J Haem* 2005; 129: 307-321

Chang HT, Huang YF, Tan W. Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. *Anal Chem* 2008; 80: 567-572

Charlton J, Sennello J, Smith D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 1997; 4: 809-816

Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 2007; 28: 869-876

Chu TC, Kwu KY, Ellington AD, Levy M. Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e73

Coughlin PB. Antiplasmin: the forgotten serpin? *FEBS J* 2005; 272: 4852-4857

Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 233-242

Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991; 66: 49-61

Dahlback B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995; 85: 607-614

Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008 Jul 1; 112: 19-27 keine Monatsangaben

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

Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1396-1400

Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway. Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1311-1320

De Agostini AI, Watkins SC, Slayter HS, Youssoufian H, Rosenberg RD. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. *J Cell Biol* 1990; 111: 1293-1304

DiScipio RG, Davie EW. Characterization of protein S, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* 1979; 18: 899-904

Drake WT, Lopes NN, Fenton JW, Issekutz AC. Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Invest* 1992; 67: 617-627

Drolet DW, Moon-McDermott L, Roming TS. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Bio-technol* 1996; 14: 1021-1025

Eckle I, Seitz R, Egbring R, Kolb G, Havemann K. Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; 372: 1007-1013

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

Ely EW, Angus DC, Williams MD, Bates B, Qualy R, Bernard GR. Drotrecogin alfa (activated) treatment of older patients with severe sepsis. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 187-195 doi: 10.1086/375775

Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism: pooled analysis of 8 case-

control studies including 2310 cases and 3204 controls: Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 809-816

Esmon CT. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun* 2000; 15: 113-116 doi: 10.1006/jaut.2000.0400

Esmon CT. The Protein C pathway. *Chest* 2003; 124: 26S-32S

Esmon CT. Protein C anticoagulant system - - anti-inflammatory effects. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 127-132

Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 7944-7947

Esmon CT, Ferrell GL, Liaw PCY, 2014 Assay for rapid detection of human activated protein C and highly specific monoclonal antibody therefor. U.S. patent 6989241. <http://www.patentgenius.com/patent/6989241.html> (Zugriffsdatum: 08.08.2011)

Espana F, Berrettini M, Griffin JH. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb Res* 1989; 55: 369-384

España F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin JH. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res* 1990; 59: 593-608

España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, Falcó C, Aznar J. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1368-1373

Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001; 345: 408-416

doi: 10.1056/NEJM200108093450603

Fay WP. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 196-202

Fay WP, Garg N, Sunkar M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1231-1237

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

Ferreira CS, Papamichael K, Guilbault G, Schwarzacher T, Gariepy J, Missailidis S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390: 1039-1050

de Fouw NJ, Haverkate F, Bertina RM, Koopman J, van Wijngaarden A, van Hinsbergh VW. The cofactor role of protein S in the acceleration of whole blood clot lysis by activated protein C in vitro. *Blood* 1986; 67: 1189-1192

Fredenburgh JC, Kretz CA, Stafford AR, Weitz JI. HD1, a thrombin-directed aptamer, binds exosite 1 on prothrombin with high affinity and inhibits its activation by prothrombinase. *J Biol Chem* 2006; 281: 37477-37485

Fumagalli R, Mignini MA. The safety profile of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2007; 11 Suppl 5: S6

Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999; 93: 1798-1808

Gailani D, Broze GJ Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253(5022): 909-912

Gal SW, Amontov S, Urvil PT, Vishnuvardhan D, Nishikawa F, Kumar PK, Nishikawa S. Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function. 1998; 252: 553-562 wo ist das Journal!?

Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, Lind B, Mannhalter C, Pabinger I, Reitsma PH, Formstone C, Cooper DN, Saito H, Suzuki K, Bernardi F, Aiach M. Protein S deficiency: a database of mutations: summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000; 84: 918

Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ Jr. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 1989; 338: 518-520

Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1988; 59:18-22

Greinacher A, Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Dtsch Arztebl* 2003; 100(34-35): A-2220 / B-1850 / C-1753

Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN- γ , or phorbol ester. *J Immunol* 1994; 153: 3664-3672

Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989-1993

Griffin JH, Gruber A. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992; 79: 2340-2348

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

Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997; 66: 101-195

Hackeng TM, Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 2015-2020

Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3106-3111

Hackeng TM, van't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994; 269: 21051-21058

Hanson SR, Harker LA, Griffin JH, Gruber A. Inhibition of platelet-dependent thrombus formation by human activated protein C in a primate model. *Blood* 1989; 73: 639-642

Heeb MJ, Espana F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987; 262: 15813-15816

Heeb MJ, Griffin JH. Physiologic inhibition of human activated protein C by α_1 -antitrypsin. *J Biol Chem* 1988; 263: 11613-11616

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

Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268: 2872-2877

Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2728-2732

Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990; 323: 1512-1516

Heinzi S. Thromboseprophylaxe auf der Intensivstation: Dalteparin und unfraktioniertes Heparin ähnlich effektiv. *Dtsch Arztebl* 2011; 108(17): A-952 / B-783 / C-783

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

van Hinsbergh VW. Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 93-106

Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 1999; 400: 769-772

Iakhiaev AV, Rezaie AR, Idell S. Thrombomodulin-mediated catabolism of protein C by pleural mesothelial and vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007; 98: 627-634

Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* 2000; 106: 873-878

Isoobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 2001; 104: 1171-1175

doi: 10.1161/hc3501.093799

Joe D, 2007: More in-depth version of the coagulation cascade. (http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Coagulation_full.svg).

Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 11199-11203

Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 meta-analyses. *Blood* 2002; 100: 3-10

Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1792-1801

Kolbel T, Strandberg K, Mattiasson I, Stenflo J, Lindblad B. *J Vasc Surg* 2006; 43: 935-939

Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 610-621

Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* 1995; 86: 1062-1071

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506

Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-4024

Kruithof EK, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* 1986; 261: 11207-11213

Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005; 106: 2605-2612

Laterre PF. Clinical trials in severe sepsis with drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2007; 11 Suppl 5: S5

Laterre PF, Garber G, Levy H, Wunderink R, Kinasewitz GT, Sollet JP, Maki DG, Bates B, Yan SB, Dhainaut JF. Severe community-acquired pneumonia as a cause of severe sepsis: Data from the PROWESS study. *Crit Care Med* 2005; 33: 952-961 doi: 10.1097/01.CCM.0000162381.24074.D7

Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 2006; 7: 216

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

Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82, 695-705

Levi M, van der Poll T. Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. *Crit Care* 2007; 11 Suppl 5: S3

Li W, Huntington JA. The Heparin Binding Site of Protein C Inhibitor Is Protease-dependent. *J Biol Chem* 2008; 238: 36039-36045

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2341-2349

Liaw PCY, Ferrell G, Esmon CT. A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation. *JthrombHaemost* 2003; 1: 662-670

Lindqvist PG, Svensson PJ, Marsaal K, Grennert L, Luterkort M, Dahlback B. Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 532-537

Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 494-499

Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence D. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 2956-2960

Loskutoff DJ, Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1-6

Lundwall A, Dackowski W, Cohen E. Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 6716-6720

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

Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky GE, Ballard DW, Planquois JMS. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated) *Crit Care* 2005; 9(Suppl 4): 38–45 doi: 10.1186/cc3747

Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ, Preston FE. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 2000; 95: 1935-1941

Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlback B. Thromboembolic disease: critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992; 68: 7-13

Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 17-25

Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. Human protein C: inactivation of factors V and VIII in plasma by the activated molecule. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370: 303-310 doi: 10.1111/j.1749-6632.1981.tb29743.x

Marcum JA, Atha DH, Fritze LMS, Nawroth PP, Stern DM, Rosenberg RD. Cloned Bovine Aortic Endothelial Cells Synthesize Anticoagulant Active Heparin Sulfate Proteoglycan. *J Biol Chem* 1986; 261: 7507-7517

Mayer G. Die chemische Biologie von Aptameren. *Angew Chem* 2009; 121: 2710-2727

Mayer G, Rohrbach F, Pötzsch B, Müller J. Aptamer-based modulation of blood coagulation. *Hamostaseologie* 2011; 31: 258-263

McNamara JO II, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1005-1015

van der Meer FJ, van Tilburg NH, van Wijngaarden A, van der Linden IK, Briët E, Bertina RM. A second plasma inhibitor of activated protein C: alpha 1-antitrypsin. *Thromb Haemostasis* 1989; 62: 756-762

Meijers JC, Marquart JA, Bertina RM, Bouma BN, Rosendaal FR. Protein C inhibitor (plasminogen activator inhibitor-3) and the risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2002; 118: 604-609

Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG, Yan B, Chao YB, Fernandez JA, Griffin JH, Hartman DL. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med* 2000; 28: 2209-2216 doi: 10.1097/00003246-200007000-00005

Michaud M, Jourdan E, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E. A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 8672-8679

Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci* 2005; 10: 1754-1762

Miletich JP. Laboratory diagnosis of protein C deficiency. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16: 169-176

Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993; 72: 477-480

Miletich J, Sherman L, Broze G Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317: 991-996

Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* 1990; 29: 1118-1128

Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 41-48

Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 459-464

Moore, KL, Andreoli, SP, Esmon, NL. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987; 79, 124-130

Moore KL, Esmon CT, Esmon NL. Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* 1989; 73, 159-165

Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J* 2003; 373: 65-70

Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109: 3161-3172 doi: 10.1182/blood-2006-09-003004

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

Müller J, Friedrich M, Becher T, Braunstein J, Kupper T, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay. *Journal of Thrombosis and Hemostasis* 2012; 10: 390-398

Müller J, El-Maarri O, Oldenburg J, Pötzsch B, Mayer G. Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2008b; 390: 1033-1037

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 Inhibitor, *Chem Biol* 2009a; 16(4): 442-451 doi:10.1016/j.chembiol.2009.03.007

Müller J, Mayer G, Pötzsch B. Maßgeschneiderte Moleküle durch Aptamertechnologie. *Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung* 2009b; 9/10: 52-55

Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K. Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood* 1996; 87: 642-647

Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* 1997; 272: L197-202

Murphy MB, Fuller ST, Richardson PM, Doyle SA. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(18): 110e

Myohanen H, Vaheri A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cellular Molec Life Sci* 2004; 61: 2840-2858

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

Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163: 740-745 doi: 10.1084/jem.163.3.740

Nayak RC, Sen P, Ghosh S, Gopalakrishnan R, Esmon CT, Pendurthi UR, Rao LV. Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking: potential functional implications. *Blood* 2009; 114: 1974-1986

Ndonwi M, Broze G Jr. Protein S enhances the tissue factor pathway inhibitor inhibition of factor Xa but not its inhibition of factor VIIa-tissue factor. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1044-1046

Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 386-391

O'Brien LM, Mastri M, Fay PJ. Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. *Blood* 2000; 95(5): 1714-1720

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

Olson ST, Björk I, Bock SC. Identification of critical molecular interactions mediating heparin activation of antithrombin. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 198-205

Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010; 92: 1587-1596

Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, Maki DG, Freebairn RC, Kinasewitz GT, Dhainaut JF, Yan SB, Williams MD, Graham DE, Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis* 2003; 37: 50–58 doi: 10.1086/375593 Quellenangaben bitte nicht trennen

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

Petitou M, Casu B, Lindahl U. 1976-1983, A Critical Period in the History of Heparin: The Discovery of the Antithrombin Binding Site. *Biochimie* 2003; 85: 83-89

Plow EF, Ploplis VA, Carmeliet P, Collen D. Plasminogen and cell migration in vivo. *Fibrinolysis Proteolysis* 1999; 13: 49-53

Pratt CW, Church FC. General features of the heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor. *Blood Coag Fibrinol* 1993; 4: 479-490

Pöttsch, Madlener. *Hämostaseologie* (2010): 750-754

van der Poll, T, Buller, HR, ten Cate, H, Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 1990; 322: 1622-1627

van der Poll, T, Levi, M, Hack, CE. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 1994; 179: 1253-1259

Pratts CW, Church FC. Heparin Binding to Protein C Inhibitor. *J Biol Chem* 1992a; 267: 8789-8794

Pratts CW, Whinna HC, Church FC. A Comparison of Three Heparin-binding Serine Proteinase Inhibitors. *J Biol Chem* 1992b; 267: 8795-8801

Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 2002; 19: 312-333

Raddatz MS, Dolf A, Endl E, Knolle P, Famulok M, Mayer G. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence activated cell sorting. *Angew Chem* 2008; 47: 5190-5193

Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 102-115

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-1134

Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 537-541

Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem* 2001; 276: 15567-15570

Rezaie AR. Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 8-15

Rezaie AR. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2059-2069

Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 2004; 103: 1992-1201

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002; 296: 1880-1882

Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Ruf W. Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J Endotoxin Res* 2003; 9: 317-321

Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 19808-19814 doi: 10.1074/jbc.M500747200

Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-917

Rintala, E, Kauppila, M, Seppala, OP. Protein C substitution in sepsis-associated purpura fulminans. *Crit Care Med* 2000; 28, 2373-2378

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

Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; 270(46): 27852-27858

Rossi C, Giardino M, Crespi D, Anghileri A, Poole D, Bertolini G; Gruppo Italiano per la Valutazione degli Interventi in Terapia Intensiva (GiViTI). The register GiViTI about the use of the drug Xigris® in the Italian intensive care units. *Recenti Prog Med* 2013;104: 246-253

Ruggerie ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120: 5-9

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007; 100: 1673-1685

Sakata Y, Loskutoff DJ, Gladson CL, Hekman CM, Griffin JH. Mechanism of protein C-dependent clot lysis: Role of plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1986; 68: 1218-1223

Schleiffenbaum B, Redondo M, 2010: Interpretation: Hämatologie – Thrombose: Medikamentöse Prophylaxe und Therapie 2010.

<http://www.viomecum.ch/index.cfm?2823045ECC80461B86423D35D3574069>

Schmaier AH. Contact activation. In: Loscalzo, Schafer AI, Hrsg. *Thrombosis and hemorrhage*. Boston: Blackwell Publishing, 1994: 87-105

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

Schulman S, Eelde A, Blombäck M, Stenflo J. The plasma concentration of activated protein C appears normal in patients with haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15: 566-570

Schütze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Mörl M, Erdmann V, Lehrach H, Konthur Z, Menger M, Arndt F, Glökler J. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 2011; 6: e29604

Seelig B, Jäschke A. A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol* 1999; 6: 167-176

Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007; 98: 530-542

Sengle G, Jenne A, Arora PS, Seelig B, Nowick JS, Jäschke A, Famulok M. Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends. *Bioorg Med Chem* 2000; 8: 1317-1329

Seré KM, Rosing J, Hackeng TM. Inhibition of thrombin generation by protein S at low procoagulant stimuli: implications for maintenance of the hemostatic balance. *Blood* 2004; 104: 3624-3630

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

Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998; 128: 8-14

Simmonds RE, Zoller B, Ireland H. Genetic and phenotypic analysis of a large (122-member) protein S-deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood* 1997; 89: 4364-4370

Slungaard A, Fernandez JA, Griffin JH, Key NS, Long JR, Piegors DJ, Lentz SR. Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo. *Blood* 2003; 102: 146-151

Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C: protein S modulates factor Xa protection. *J Biol Chem* 1988; 263: 14884-14890

Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10212-10216

Stenflo J, Fernlund P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 12180-12190

Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9: 59-88

Strandberg K, Svensson A, Stenflo J. Stabilite tubes contain strongly acidic citrate prevent in vitro complex formation between activated protein C and protein C inhibitor. *Thromb Haemost* 2003; 89: 947-949

Strandberg K, Kjellberg M, Knebel R, Lilja H, Stenflo J. A sensitive immunochemical assay for measuring the concentration of the activated protein C-protein C inhibitor complex in plasma: use of a catcher antibody specific for the complexed/cleaved form of the inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 604-610

Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood* 2003; 102: 1499-1505

Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-522

Tasset DM, Kubik MK, Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol* 1997; 272: 688-698

Taylor, FBJ, Chang, A, Esmon, CT. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987; 79, 918-925

Taylor FB Jr, Dahlback B, Chang AC. Role of free protein S and C4b binding protein in regulating the coagulant response to *Escherichia coli*. *Blood* 1995; 86, 2642-2652

Taylor FBJ, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000; 95: 1680-1686

Ten Cate H, Timmerman JJ, Levi M. The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 713-717

Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlback B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood* 1999; 93: 2552-2558

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

Varadi K, Rosing J, Tans G, Schwarz HP. Influence of factor V and factor Va on APC-induced cleavage of human factor VIII. *Thromb Haemost* 1995; 73: 730-731

Vary TC, Kimball SR. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol* 1992; 262: C445-452

Wang W, Boffa M, Bajzar L, Walker J, Nesheim M. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998; 273: 27176-27181

Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein: a possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; 255: 5521-5524

Walker FJ. Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin Thromb Hemost.* 1984;10: 131-138

van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost.* 1996; 76: 397-403

Wiman B, Collen D. Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *Eur J Biochem* 1977; 78: 19-26

Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1374-1383

Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of 3 tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988; 263: 6001-6004

Yan SB, Dhainaut JF: Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29: S69-74

Yang L, Bae JS, Manithody C, Rezaie AR. Identification of a specific exosite on activated protein C for interaction with protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 2007; 282: 25493-25500

Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Contribution of basic residues of the 70–80-loop to heparin binding and anticoagulant function of activated protein C. *Biochemistry* 2002; 41: 6149-6157

Zeerleder S, Hack CE, Wuillemin WA. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest* 2005; 128: 2864-2875

Zhang H, Li XF, Le XC. Tunable aptamer capillary electrophoresis and its application to protein analysis. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 34-35

Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995; 85: 3524-3531

Zorio E, Gilabert-Estelles J, Espana F, Ramon LA, Cosin R, Estelles A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem* 2008; 15: 923-929

8. Danksagung

Ich möchte allen Personen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, meinen Dank aussprechen, insbesondere:

Herrn PD Dr. biol.hom. J. Müller für die Überlassung des Themas zur Bearbeitung, sowie für die wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit,

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

den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima,

meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben, sowie meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.