

Untersuchungen zur Rolle von thrombozytärem Faktor V in der Regulation der Gerinnungsaktivierung

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

Samuel Pfahler

aus Warburg

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.02.2022

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

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	8
1.1	Physiologie der Blutgerinnung	8
1.1.1	Primäre Hämostase	8
1.1.2	Sekundäre Hämostase	9
1.1.3	Fibrinolyse	11
1.2	Regulation der Hämostase	12
1.2.1	Protein C/S-System	12
1.2.2	Antithrombinsystem	13
1.2.3	TFPI-System	13
1.3	Aufbau und Funktion von Faktor V	14
1.3.1	Regulation der Faktor V Aktivität	15
1.4	Thrombozytärer Faktor V	17
1.4.1	Aufnahme von Faktor V in Megakaryozyten	17
1.4.2	Enzymatische Besonderheiten des thrombozytären Faktor V	17
1.5	Gerinnungsstörungen	18
1.5.1	APC-Resistenz / FV-Leiden	18
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Verwendete Chemikalien	20
2.1.2	Verwendete Reagenzien	20
2.1.3	Verwendete Puffer- und Gebrauchslösungen	22
2.1.4	Verwendete Geräte	23
2.1.5	Verwendetes Gebrauchsmaterial	24
2.2	Methodik	24
2.2.1	Gewinnung und Herstellung von Thrombozytenlysaten	24
2.2.2	Bestimmung der Faktor V Konzentration durch koagulometrische Messung	25

2.2.3	Bestimmung der Faktor IX-Konzentration durch koagulometrische Messung	25
2.2.4	Enzymatische Messung der Faktor Va-Konzentration	26
2.2.5	Enzymatische Messung der Faktor V-Gesamtkonzentration nach Faktor V Aktivierung mit RVV	27
2.2.6	Enzymatische Messung der Faktor V-Konzentration nach Faktor Va Inaktivierung durch aPC	28
2.2.7	Enzymatische Messung der Faktor V-Gesamtkonzentration nach Aktivierung von Faktor V durch Thrombin	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Testetablierung durch Vorversuche im gereinigten System	30
3.1.1	Nachweis der kompletten Reinigung des Lysates von plasmatischen Bestandteilen	30
3.1.2	Alleiniger Umsatz des Substrates I-1560 durch Thrombin	30
3.1.3	Ermittlung der im enzymatischen Test einzusetzenden FXa-Konzentration	31
3.1.4	Ermittlung der im enzymatischen Test einzusetzenden Prothrombin- Konzentration	32
3.1.5	Ermittlung der optimalen Standardkurve von plasmatischem FVa mittels enzymatischer Messmethode	33
3.1.6	Ermittlung der einzusetzenden Lysatverdünnung bei enzymatischer FVa-Bestimmung	34
3.1.7	Kontrolle auf Aktivitätsverlust durch Lagerung des Lysats bei -80°C	35
3.1.8	Hemmung der durch Thrombin vermittelten FV-Aktivierung	36
3.1.9	Ermittlung der in der Gesamt-FV-Bestimmung eingesetzten RVV-Konzentration	37
3.1.10	Ermittlung des optimalen aPC-Inaktivators	38
3.1.11	Auswirkungen von aPC auf thrombozytären FV	39
3.1.12	Auswirkungen von FXa auf im Lysat vorhandenen thrombozytären FV	40
3.1.13	Bestimmung der Relevanz einer Aktivierung von im Lysat vorhandenem FV durch FXa im verwendeten Versuchsaufbau	42
3.1.14	Vortest zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Variabilität der enzymatischen Versuche	43
3.2	Ergebnisse der Messung mit entwickeltem Testverfahren	44

3.2.1	Anreicherung von Thrombozyten aus gewonnenem Blut	44
3.2.2	Koagulometrisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration	45
3.2.3	Enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration	46
3.2.4	Enzymatisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration	47
3.2.5	Korrelation der enzymatischen und koagulometrischen FV-Bestimmung	48
4.	Diskussion	50
4.1	Vergleichbarkeit mit bisheriger Literatur	50
4.2	Herstellung der Thrombozytenlysate	52
4.3	Koagulometrische Gesamt-Faktor V-Bestimmung	53
4.4	Versuchsansatz zur enzymatischen Faktor V-Bestimmung	54
4.5	Enzymatische Faktor Va-Bestimmung	55
4.6	Enzymatische Gesamt-Faktor V-Bestimmung	57
4.7	Klinische Relevanz der etablierten Testverfahren	58
5.	Zusammenfassung	61
6.	Abbildungsverzeichnis	62
7.	Tabellenverzeichnis	63
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Danksagung	73
10.	Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
aPC	aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CD 41	Cluster of Differentiation 41 (CD-Antigen)
FpA	Fibrinopeptid A
FpB	Fibrinopeptid B
FFP	frisches gefrorenes Plasma
FGF-2	basischer fibroblastischer Wachstumsfaktor
F V	Faktor V (Proaccelerin)
F VII	Faktor VII (Prokonvertin)
F VIII	Faktor VIII (Antihämophiles Globulin A)
F IX	Faktor IX (Christmas-Faktor)
F X	Faktor X (Stuart-Prower-Faktor)
F XI	Faktor XI (Rosenthal-Faktor)
F XII	Faktor XII (Hageman-Faktor)
FXIII	Faktor XIII (Fibrinstabilisierender Faktor)
GPIb/IX	Glykoprotein Ib/IX (von Willebrand-Rezeptor)
K_a	Spezifitätskonstante
K_{cat}	katalytische Konstante
K_m	Michaeliskonstante
LDL-R1	Low density lipoprotein Rezeptor 1

LMWH	Low molecular weight heparins (niedermolekulare Heparine)
MCP 1	Chemokin MCP-1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLG	Plasminogen
PRP	Platelet rich Plasma (Thrombozyten reiches Plasma)
RVV	Russel's Viper Venom
TF	Tissue Factor (Gewebethromboplastin)
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
UFH	unfraktionierte Heparine
uPA	Urokinase-type plasminogen activator (Urokinase)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor

1. Einleitung

1.1 Physiologie der Blutgerinnung

Kommt es in Folge von Verletzungen zu einem Kontinuitätsverlust der Blutgefäße, führt dies zu einem ungewollten Blutverlust aus dem Gefäßsystem. Um diese Blutung möglichst gering zu halten, kann der Körper einen schnellen Gefäßverschluss erzielen. Dieser physiologische Vorgang der Blutgerinnung wird als Hämostase bezeichnet. Hierbei kann das erste reversible Abdichten durch eine thrombozytäre Blutstillung (primäre Hämostase), der feste Verschluss des Defektes mittels Fibringerinnsel (sekundäre Hämostase) und das regulierende Auflösen von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) unterschieden werden.

1.1.1 Primäre Hämostase

Nach Schädigung der Gefäßwand entsteht initial ein loser Verschluss der Defektstelle. Dieser wird hauptsächlich durch Thrombozytenanlagerung vermittelt. Eine lokale Vasokonstriktion mittels vasoaktiver Mediatoren und neurogener Reflexmechanismen begünstigt dies (Palta et al., 2014). Die thrombozytäre Aktivität kann hierbei in Adhäsion, Aktivierung und Aggregation unterteilt werden. Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten, als kleinster zellulärer Bestandteil des Blutes, am äußeren Rand des Blutstroms (Fitzgibbon et al., 2015). Hierbei gehen sie jedoch keine feste Verbindung mit der antiadhäsiven Endothelwand ein (van Hindsbergh, 2012). Liegen nach Zerstörung der Gefäßintima Teile der subendothelialen Strukturen frei, kommt es unverzüglich zu einem Anhaften von ersten Thrombozyten. Diese Verbindung wird zunächst durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, welcher als Bindeglied zwischen subendotheliale Kollagen und thrombozytärem Glykoprotein Ib/IX (GPIb/IX) dient (Savage et al., 1998). VWF liegt unter physiologischen Bedingungen als im Blutplasma gelöstes multimeres, globuläres Glykoprotein vor und dient u. a. auch als Bindungspartner für FVIII zu dessen Schutz vor Proteolyse. Kommt es zu einer Bindung zwischen vWF und Kollagen, wird durch entstehende Scherkräfte eine Konformationsänderung bewirkt, welche die hochaffine Bindungsstelle für GPIb/IX freilegt (Ruggerie, 2007). Die entstandene Anhaftung der Thrombozyten wird jetzt über die Bindung zwischen thrombozytärem Glykoprotein VI mit Kollagen verstärkt (Moroi et al.,

1996). Durch diesen als Thrombozytenadhäsion beschriebenen Vorgang werden gebundene Thrombozyten über intrazelluläre Signalwege aktiviert. Es kommt in Folge einer Konformationsänderung zur Umkehr von nach innen gelagerten Membranbestandteilen an die Zelloberfläche, zur Ausbildung von Pseudopodien, sowie zur Freisetzung von Thrombozyteninhaltsstoffen aus gespeicherten Granula. Eine weitere fördernde Rolle der Thrombozytenaktivierung spielen freiwerdende lösliche Mediatoren, welche über einen G-Protein gekoppelten Signalweg agieren (Li et al., 2010). Im letzten Schritt der primären Hämostase führt eine reversible Bindung zwischen thrombozytärem Glykoprotein IIb/IIIa und Fibrinogen über Quervernetzungen zur Ausbildung erster Aggregate, dem sogenannten weißen Thrombus (Ma, 2007).

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase, ermöglicht eine feste, irreversible Abdichtung des Gefäßsystems. Hierbei treten im Plasma gelöste Proenzyme in den Vordergrund. Diese Enzyme werden durch limitierte proteolytische Spaltung kaskadenartig aktiviert, was letztlich in einer festen Vernetzung von Fibrinmonomeren mündet. Macfarlane hat in den 1960er Jahren dieses, wie in Abbildung 1 gezeigte, System der wasserfallartigen Gerinnung mit zwei Wegen der Aktivierung beschrieben (Macfarlane, 1964). Ausgehend von ihrem Startpunkt wurden diese beiden Wege als extrinsischer bzw. intrinsischer Weg benannt. Das heutige Verständnis der plasmatischen Gerinnung beschreibt einen authentischeren Ablauf der Gerinnung (Palta et al, 2014). Der ehemals beschriebene Startpunkt des intrinsischen Wegs wird heute der sogenannten Kontaktaktivierung zugeordnet (Naudin et al., 2017).

Nach der Verletzung kommt es in Folge des oben beschriebenen Endotheldefekts zu Kontakt zwischen Tissue Faktor (TF, auch Gewebethromboplastin genannt) und aktiviertem FVII (FVIIa). TF ist in der Membran von subendothelialen Strukturen wie Gefäßmuskelzellen oder Fibroblasten enthalten und wird nach einem Trauma an der Oberfläche exprimiert. FVII wiederum liegt als im Plasma gelöstes Glycopeptid vor. Hiervon sind bereits etwa ein Prozent zu einer doppelsträngigen Protease aktiviert. FVIIa und TF können unter Anwesenheit von Phospholipiden und Kalzium einen membranständigen Komplex bilden, welcher weiteren FVII sowie die Faktoren X und IX aktiviert (MCVey, 2016; Preissner 2010b). Entstehender FXa kann jetzt Prothrombin zu

Thrombin umsetzen. Hierbei entstandenes Thrombin kann weitere in der Nähe befindliche Thrombozyten aktivieren, welche nun ihre α -Granula entleeren. Dadurch wird unter anderem Thrombozyten assoziierter FV/Va frei (Alberio et al., 2000). Als Serinprotease kann Thrombin wiederum Fibrinogen, die Faktoren XI und XIII, die Akzeleratoren FV und FVIII und Protein C aktivierend umsetzen (Preissner, 2010a). FXIa kann nun, ebenso wie FVIIa/TF, FIX in FIXa umwandeln (Ogawa et al., 2005). Die jetzt entstandenen Faktoren IXa und VIIIa bilden zusammen mit Kalzium und Phospholipiden einen membranständigen Komplex, welcher nun große Mengen an FX umsetzt. Hierdurch entstehender FXa bildet ortsständig zusammen mit FVa, Phospholipiden und Kalzium den Prothrombinase-Komplex. Durch Anwesenheit dieses Komplexes wird die Aktivität von FXa um mehr als das 1000-fache erhöht und somit große Mengen Prothrombin in Thrombin überführt (Krishnaswamy et al., 1987). Das nun reichlich gebildete Thrombin kann Fibrinogen proteolytisch spalten. Hierbei werden von Fibrinogen das Fibrinopeptid A (FpA) von der α -Kette und das Fibrinopeptid B (FpB) von der β -Kette am jeweiligen N-terminalen-Ende abgespalten. Freiwerdende Bindungsstellen setzen einen Polymerisationsprozess der einzelnen Fibrinfibrillen in Gang. Die von Thrombin aktivierte Transglutaminase FXIIIa führt anschließend zu einer raschen Quervernetzung der γ -Ketten der Fibrinmonomere über ϵ -Glutamyl-Lysin-Brücken. (Lord, 2007)

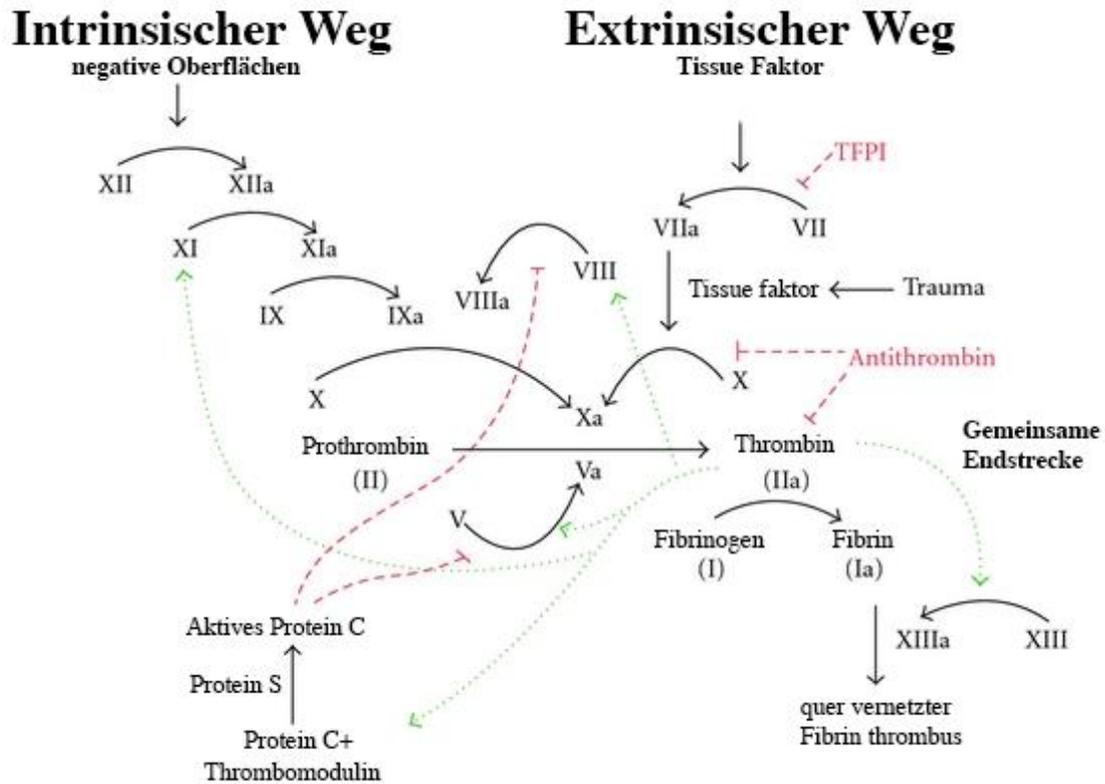


Abb. 1: Schema der sekundären Hämostase. Zeigt den schematischen Ablauf der Gerinnungskaskade. (modifiziert nach Knesek und Peterson, 2012)

Die Kontaktaktivierung entsteht durch Berührung von im Plasma gelöstem FXII mit negativen Oberflächen. Diese sind beispielsweise in Kollagen, Glas oder an Fettsäuren vorhanden. Durch diesen Kontakt kommt es zur Autoaktivierung und Konformationsänderung von FXII, wodurch Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen in ihre aktive Form überführt werden. Durch eine Feedback-Schleife wird wiederum FXII aktiviert. FXIIa kann als Serinprotease FXI aktivieren, welcher anschließend FIX aktiviert. FIXa bildet zusammen mit FVIIIa, Phospholipiden und Kalzium einen Komplex, der wiederum FX aktiviert. Entstehender FXa führt dann, wie oben beschrieben, in die gemeinsame Endstrecke der Hämostase (Naudin et al., 2017).

1.1.3 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse ist ein wichtiger körpereigener Prozess zur Kontrolle der Koagulation. Sie dämmt (indirekt) das Entstehen eines Fibringerinnsels ein und vermittelt eine

Rekanalisation nach thrombotischen Ereignissen. Zentrale Rolle der Fibrinolyse nimmt hierbei das von der Leber produzierte und im Plasma zirkulierende Proenzym Plasminogen (PLG) ein (Raum et al., 1980). Die hauptsächlich von Endothelzellen freigesetzten tissue-type Plasminogen Activator (tPA) und Urokinase (uPA) können PLG in seine aktive Form Plasmin umwandeln. Auch für die prokoagulatorischen Faktoren XIa, XIIa und Kallikrein wurde eine Plasminogenaktivierung nachgewiesen (Colman, 1968; Goldsmith et al., 1978). In einer positiven Feedbackschleife kann Plasmin wiederum durch Proteolyse die Aktivität von tPA und uPA steigern. Auch Fibrin kann, durch Bindung an Plasminogen und tPA, deren Aktivität steigern. Plasmin kann nun Fibrin in dem über FXIII quervernetzten Verband spalten, wodurch klinisch relevante D-Dimere entstehen. Zu den weiteren Plasmin-Substraten gehören unter anderem auch Plasminogen, Matrix-Proteine, Kollagen, Laminin und Fibronectin. (Cesarman-Maus und Hajjar, 2005).

1.2 Regulation der Hämostase

Um die Gerinnung unter physiologischen Bedingungen auf den Ort der lokalen Verletzung zu begrenzen, bedient sich der Körper mehrere inhibitorischer Systeme. Hierbei können grundsätzlich drei Arten von Inhibitoren unterschieden werden: Serin-Protease-Inhibitoren wie Antithrombin, die Serinprotease Protein C und Kunitz-Inhibitoren wie der Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI).

1.2.1 Protein C/S-System

Protein C und Protein S werden in der Leber durch Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung hergestellt (Stief, 2019). Hierbei dient Protein C als Proenzym und Protein S als sein Kofaktor. Protein C wird durch das in der Gerinnung zentral wirkende Thrombin mittels limitierter Proteolyse aktiviert. Für diesen Aktivierungsschritt wird Thrombin durch den Thrombin-Rezeptor Thrombomodulin gebunden, der auf Endothelzellen exprimiert ist. Dieser steht in enger Verbindung mit einem Endothel-Protein-C-Rezeptor, welcher eine lokale Anreicherung der Bindung von Protein C ermöglicht. Aktiviertes Protein C (aPC) kann nun die Kofaktoren V, Va und VIIIa über limitierte Proteolyse spalten und damit inaktivieren (Esmon und Schwarz, 1995). Weiterhin wird aPC eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Diese wird durch eine Verringerung der Nf- κ B abhängigen Translokation von Entzündungsmediatoren erreicht (Esmon, 2012).

1.2.2 Antithrombinsystem

Das 58 kD große Glykoprotein Antithrombin ist der bedeutendste Vertreter der gerinnungshemmenden Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Seine offizielle Bezeichnung nach Nomenklatur der Serpine ist SERPINC1. Die antikoagulatorische Hauptfunktion liegt in der Inaktivierung von Thrombin und FXa. Jedoch kann auch jede andere prokoagulatorische Serinprotease des Gerinnungssystems (Faktoren IXa, XIa, XIIa und Kallikrein) durch Antithrombin inhibiert werden. Zur Inaktivierung bildet Antithrombin mit den genannten Faktoren einen irreversiblen Komplex. Hierfür muss der sog. reactive center loop durch die zu inaktivierende Protease gespalten werden. Dieser Vorgang wird durch Bindung von aus Endothel freigesetzten Pentasacchariden oder im Blut zirkulierenden Heparinen an Antithrombin und einer damit einhergehenden Konformationsänderung beschleunigt. Größere Heparinmoleküle können zudem auch als Verbindungsanker zwischen Antithrombin und der zu inaktivierenden Protease wirken (Jackson, 2010). Nach aktuellem medizinischem Stand bildet Heparin eine wichtige Säule der therapeutischen Thromboseprophylaxe. Seit den 1940er Jahren stehen hierfür subkutan oder intravenös verabreichbare unfraktionierte Heparine (UFH) zur Verfügung. Diese wurden ursprünglich aus Rinderlunge gewonnen und übernehmen als Molekül aus mindestens 18 Saccharideinheiten die oben genannte Beschleunigung der Antithrombin-Aktivität. Aus diesen UFH konnten durch verschiedene chemische und enzymatische Verfahren ebenso wirksame Pentasaccharide isoliert werden. Diese als niedermolekulare Heparine (LMWH) bekannten Moleküle bedürfen einer deutlich geringeren Dosierung als UFH. Der prophylaktische Einsatz von UFH und LMWH reduzierte nachweislich das Auftreten eines thrombotischen Ereignisses bei endoprothetischen Operationen oder Erkrankungen mit stark erhöhtem Risiko auf eine Thrombose um 60 % (Franchini et al. 2016, Hemker 2016).

1.2.3 TFPI-System

Der TFPI gehört zu den wichtigsten Inhibitoren der startenden Gerinnung. TFPI liegt hauptsächlich an Endothel gebunden vor. Unter Anwesenheit von Heparin kann TFPI in größerem Maß freigesetzt werden. Als Kunitz-Typ-Inhibitor bewirkt er eine Hemmung von FXa und des TF/FVIIa-Komplex. Die Bindung von TFPI an FXa ist primär reversibel, führt jedoch durch Ausbildung des quartären Komplexes zur irreversiblen Inaktivierung der

Enzyme. (Wood et al., 2014) Diese inhibitorische Wirkung kann durch Anwesenheit von FV, Protein S, Phospholipiden und unfraktioniertem Heparin verstärkt werden. Durch Thrombin aktivierter FV beeinträchtigt wiederum die TFPI-Aktivität (Peraramelli et al., 2016). Es konnten zwei Isoformen des TPFI ausgemacht werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. Besonders zu nennen sei hierbei die TFPI α -Isoform, welche eine spezifische Inhibition des Prothrombinasekomplexes aufweist. Hierfür bindet das C-Terminale Ende des TFPI α an einen sauren Bereich der B-Domäne von durch FXa aktiviertem, bzw. von Thrombozyten freigesetztem FV. An Prothrombinasekomplex gebundener TFPI α hemmt über seine K2-Struktur das aktive Zentrum von FXa und damit die Thrombin-Generierung (Wood et al. 2014). Durch alternatives Spleißen kann eine verkürzte Isoform von FV (FV-Short) entstehen. Dieser Isoform fehlen 702 Aminosäuren in der B-Domäne. Hierdurch wird ein negativ geladener Teil der B-Domäne freigelegt, wodurch die Bindungsaffinität von TFPI α erhöht wird. FV-Short dient durch Bindung von TFPI α als Trägersubstanz im normalen Blutstrom. Mutationsbedingte Konzentrationsveränderungen von FV-Short können zu, die Gerinnung beeinflussenden, Veränderungen der TFPI α -Konzentration im Blutstrom führen. Des Weiteren zeigt sich FV-Short zusammen mit Protein S als effizienter synergistischer Cofaktor für TFPI α (Dahlbäck 2016, Dahlbäck et al. 2017).

1.3 Aufbau und Funktion von Faktor V

Das als Faktor V benannte Protein wurde erstmals 1948 von Owren (Owren, 1948) beschrieben. Es handelt sich um ein 330.000 kD großes Glykoprotein, welches in der Leber durch Hepatozyten gebildet wird (Duckers et al., 2010). Das hierfür codierende Gen befindet sich auf Chromosom 1q21-25 (Kane et al, 1987). Etwa 80 % des Gesamtanteils im menschlichen Körper liegt als im Plasma zirkulierendes Protein vor. Hingegen sind 20% in den α -Granula von Thrombozyten als Thrombozyten-assoziiertes FV gespeichert (Tracy et al., 1982). Hier liegt er sowohl in seiner inaktiven (FV) als auch in seiner aktiven Form (FVa) in einem Komplex an Multimerin gebunden vor (Jeimy und Fuller, 2008). Wird FV in seine aktive Form FVa überführt, wirkt er als Akzelerationsglobulin. Er besitzt somit keine eigene proteolytische Aktivität, sondern kann als Kofaktor enzymatische Prozesse beeinflussen. Durch Anwesenheit von Faktor Va wird der Umsatz der Serinprotease FXa um mehr als das 1000-fache gesteigert. Dies stellt eine wichtige Regulation des

Gerinnungssystems dar (Duckers et al., 2010). 2002 beschrieb Nicolaes eine zusätzliche antikoagulatorische Funktion von FV. Wenn das Protein auf Phospholipidoberflächen gebunden ist, kann es durch aPC in Faktor Vac umgesetzt werden. Hierbei verliert es seine prokoagulatorische Fähigkeit, kann jedoch jetzt, zusammen mit Protein S, als Kofaktor für Protein C wirken. Dies führt wahrscheinlich zu einer beschleunigten Inaktivierung von Faktor VIIIa (Nicolaes und Dahlbäck, 2002).

1.3.1 Regulation der Faktor V-Aktivität

Die Aktivierung von FV zu FVa kann über verschiedene Wege erfolgen. Wichtigster Vertreter ist hierbei die Serinprotease Thrombin, welche FV durch proteolytische Spaltung an den Positionen Arg709, Arg1018 und Arg1545 aktiviert (Keller et al., 1995). Auch FXa und die Neutrophilen-Elastase können in vivo FV in seine aktive Form umwandeln (Monkovik et al., 1990 b; Samis et al., 1997). Die Aktivierung von FV zu FVa durch Thrombin oder FXa wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Eine potente in vitro Aktivierung ist durch das Russel's Viper Venom (RVV) durch gezielte proteolytische Spaltung an Arg 1545 möglich (Yadav et al., 2017). Bei Spaltung an den drei oben genannten Stellen entstehen neben zwei Aktivierungspeptiden mit 71.000 kD und 150.000 kD eine mit 105.000 kD schwere und mit 74.000 kD leichte Kette. Diese beiden Ketten verbleiben, vermittelt durch Kalzium, nicht kovalent gebunden und bilden FVa (Monkovik et al., 1990 a). P. van Doorn konnte zeigen, dass TPFI- α die Aktivierung von FV durch Blockade der Spaltung an Arg 1545 verhindern kann (van Doorn et al., 2017).

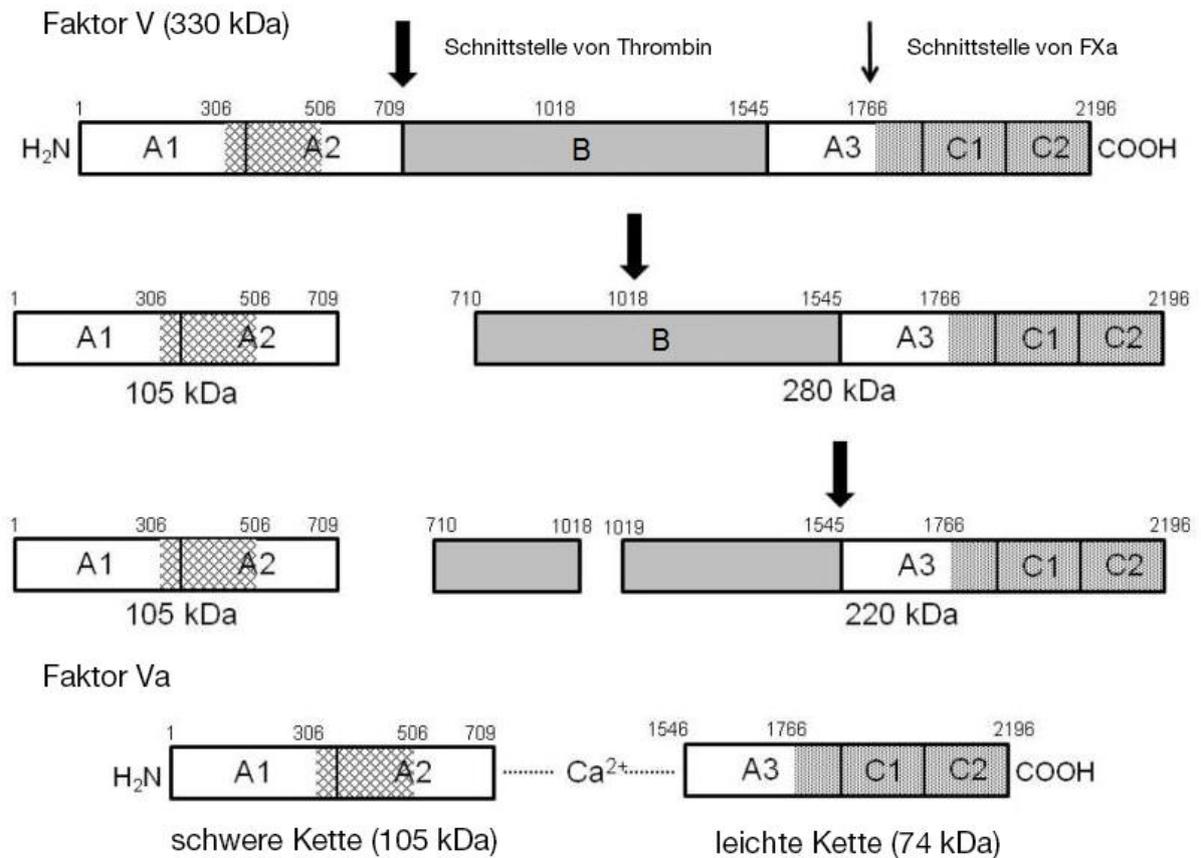


Abb. 2: Faktor V Aktivierung. Gezeigt ist die schematische Aktivierung von FV. Die dicken Pfeile geben die Spaltung an den Positionen 709, 1018 und 1545 durch Thrombin an. Der dünne Pfeil zeigt die Spaltung an Position 1766 bei Aktivierung durch FXa. Die entstehende schwere und leichte Kette ist nicht kovalent über Ca²⁺ verbunden (nach Ayombil et al., 2013).

Die Inaktivierung von FV und FVa geschieht hauptsächlich durch aPC. Durch die Spaltung von FVa an den Positionen Arg 306, Arg 506, Arg 679 und Arg 994 erfolgt hierbei eine Inaktivierung des prokoagulatorischen Kofaktors (Kalafatis et al., 1994). Ein von aPC vermittelter Schnitt an der Position Arg-506 kann eine antikoagulatorische Funktion von FV auslösen. Mehrere Versuche mit Einsatz von an verschiedenen Positionen verändertem FV haben gezeigt, dass der C-Terminale Teil der B-Domäne hierbei als wichtiger Strukturteil für die antikoagulatorische Wirkung von Faktor Vac dient (Segers et al, 2007; Thorelli et al., 1998; Thorelli et al., 1999).

1.4 Thrombozytärer Faktor V

In Thrombozyten aufgenommener FV zeigt einige strukturelle Besonderheiten im Vergleich zu plasmatischem FV. Hierzu zählt unter anderem eine verkürzte leichte Kette, welche schon an Tyr¹⁵⁴³ und nicht an Arg¹⁵⁴⁵ geschnitten wird. Des Weiteren ist die schwere Kette an der Stelle Thr⁴⁰² mit N-acetylglucosamin oder N-acetylgalactosamin o-glykosyliert. In Folge dessen ist sie gegen eine durch thrombozyten-assoziierte Kinasen vermittelte Phosphorylierung an Ser⁶⁹² resistent (Bouchard et al., 2006).

1.4.1 Aufnahme von Faktor V in Megakaryozyten

Durch Northern Blotting von lysierten Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten, konnte belegt werden, dass diese keine FV-spezifische mRNA beinhalten. Es wurde somit ausgeschlossen, dass Megakaryozyten selbst FV produzieren. FV wird hingegen im Rahmen der Thrombozytopoese in die Vorläufer der Thrombozyten internalisiert. Diese Aufnahme geschieht ausschließlich durch CD42b⁺ Megakaryozyten (Gerz et al., 2018). Die Clathrin-abhängige Endozytose von plasmatischem FV wird hierbei durch den Low density lipoprotein Rezeptor 1 (LDL-R1) vermittelt (Bouchard et al., 2008). Um weitere Vorgänge nach der Endozytose besser zu verstehen, wurden ex-vivo abgeleitete Megakaryozyten mittels konfokaler-Mikroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich ein gleichzeitiges Auftreten von fluoreszenzmarkiertem FV und verschiedenen, organspezifischen, fluoreszierenden Antikörpern. Eine Stunde nach Endozytose lagerten sich $87,8 \pm 7,2$ % des FV dem frühen endosomalen Antikörper gegen das Protein Rab5 an. Nach einer weiteren Stunde konnte FV in räumlicher Nähe zu einem Antikörper gegen das Protein GM 130 nachgewiesen werden ($53,2 \pm 23,0$ %). GM 130 wird als Teil des *cis*-Golgi-Netzwerks beschrieben. Diese Interaktion mit dem Golgi-Netzwerk erklärt eine nachträgliche Modifikation von FV. Nach 19 Stunden wurde die räumliche Nähe zu vWF ($84,2 \pm 3,7$ %) oder P-Selectin ($54,8 \pm 3,5$ %) beobachtet. Hieraus lässt sich die Speicherung in α -Granula ableiten. (Bouchard et al., 2006).

1.4.2 Enzymatische Besonderheiten des thrombozytären Faktor V

Plasmatischer FV hat als einzelsträngiges Protein nahezu keine Grundaktivität und erfährt nach seiner Umwandlung in plasmaassoziierten FVa eine Aktivitätssteigerung um das bis zu 400-fache. Thrombozytärer FV zeigt hingegen schon in seiner Grundform eine

signifikante Aktivität als Kofaktor. Nach Aktivierung durch FXa oder Thrombin wird diese Grundaktivität lediglich um das Zwei- bis Dreifache gesteigert. Aktivitätsanalysen haben gezeigt, dass FXa thrombozytären FV 50- bis 100-Mal effektiver als Thrombin aktiviert. Die finale Kofaktoraktivität wird sowohl von plasmatischem, als auch von thrombozytärem FVa durch die über Ca^{2+} verbundene leichte und schwere Kette ausgelöst. Es besteht hierbei kein nachweisbarer Aktivitätsunterschied. Thrombozytärer FV/Va besitzt jedoch, wenn er mit seinem plasmatischen Gegenstück vermischt wird, eine zwei- bis dreifach höhere Resistenz vor der Inaktivierung durch aPC (Carmire et al., 1998; Monkovic et al., 1990 b; Rand et al., 1994).

1.5 Gerinnungsstörungen

Damit die Gerinnung in ihrem physiologischen Maß ablaufen kann, müssen alle Einzelfaktoren in richtiger Menge und gezielter Funktion ineinandergreifen. Ist ein prokoagulatorischer Faktor nicht mehr funktionstüchtig oder fehlt gänzlich, wird die Gerinnung an dem von ihm vermittelten Schritt stehen bleiben. Unberechenbare Blutungen wären die daraus resultierende Folge. Fehlt andererseits ein Inhibitor der Gerinnung oder ist ein Inhibitor in seiner Funktion stark eingeschränkt, kommt es zu einer vermehrten Koagulation mit erhöhter Thrombosegefahr.

1.5.1 APC-Resistenz / FV-Leiden

1995 konnte dieses Erkrankungsbild als Ursache eines deutlich erhöhten Thrombophilie-Risikos dargelegt werden (Bertina et al., 1995). Weiterhin stellte sich heraus, dass FV-Leiden die häufigste Ursache einer primären und rezidivierenden Venenthromboembolie bei Frauen ist. Ursächlich konnte eine Mutation des FV-Gens identifiziert werden. Hierdurch wird bei FV an Position 506 Arginin durch Glutamin ersetzt. Diese Veränderung des Proteinaufbaus führt zu einer Resistenz gegen die proteolytische Spaltung durch aPC, woraus eine fehlende antikoagulatorische Kontrolle von FVa mit erhöhter Thrombosegefahr resultiert. Es besteht ein autosomal-dominanter Erbgang. Heterozygote Erbträger haben ein fünf- bis zehnfach erhöhtes Thromboserisiko. Homozygote Erbträger sogar ein 50- bis 100-fach erhöhtes Risiko. (Albagoush und Schmidt, 2019; Ament, 2003)

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Thrombozytärer FV spielt eine Rolle in der am Ort einer Gefäßverletzung einsetzenden Thrombinbildung. Einige Voruntersuchungen deuten darauf hin, dass der in Thrombozyten vorliegende FV zum Teil oder sogar vollständig in der aktiven Form vorliegt. Bisher existieren keine systematischen Untersuchungen über interindividuelle Unterschiede in der thrombozytären FV-Konzentration. Auch ist unklar, ob es innerhalb des thrombozytären FV-Pools größere interindividuelle Schwankungen im Verhältnis von aktiviertem FV zu inaktivem FV gibt. Um diese Frage zu beantworten, war es das Ziel dieser Arbeit eine quantitative Messmethode für thrombozytären FV/FVa zu entwickeln. Durch diese Messmöglichkeit und Kenntnisse über die durchschnittliche FV-Konzentration sollen neue Forschungsansätze im Hinblick auf das Krankheitsbild der APC-Resistenz / Faktor V-Leiden ermöglicht werden. So könnte die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der thrombozytären FV-Konzentration bei APC-Resistenz-Patienten die Grundlage für neue Untersuchungsmethoden erbringen. Des Weiteren könnte eine genaue Bestimmung der thrombozytären FV-Konzentration neue Informationen über die Wahrscheinlichkeit von thrombotischen Ereignissen und deren therapeutische Steuerung ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)

Kaliumchlorid (KCl)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Natriumhydrogenphosphat (NaH₂PO₄)

Magnesiumchlorid (MgCl₂)

D(+)-Glucose (C₆H₁₂O₆)

Natriumcitrat (C₆H₅Na₃O₇)

Citronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇)

Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O))

B. Braun AG, Melsungen

Aqua Dest.

Frisenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

0,9 % NaCl-Lösung

2.1.2 Verwendete Reagenzien

The Medicines Company Deutschland GmbH, München

Angiox[®] 250 mg (Bivalirudin)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Bovine Serum Albumin (BSA)

Medion Grifols Diagnostics AG, Düdingen – Schweiz

Specific Albumin 30 %

Cellsystems Biotechnologie Vertriebs GmbH, Troisdorf

Human Factor Xa; Lot: EE1102-0.1MG (10µg/ml in 10 mmol/L TrisHCl, 0,1 % Albumin)

Haematologic technologies inc., Essex Junction - USA

Human Faktor Va; Lot: GG 1031-0.5MG (20 µg/ml in 10 mmol/L TrisHCl, 0,1 % Albumin, 5 nM CaCl₂)

Human Prothrombin; Lot: FF1117-2MG (10 µg/ml in 10 mmol/L TrisHCl, 0,1 % Albumin)

Human Faktor V; Lot: EE0603-0,5MG (20 µg/ml in 10 mmol/L TrisHCL, 0,1 % Albumin, 5 nM CaCl₂)

Human alpha Thrombin; Lot: FF0315-1MG (10 µg/ml in 10 mmol/L TrisHCl, 0,1 % Albumin)

Loxo GmbH, Dossenheim

RVV-Faktor V Aktivator; Lot:41933801 (10 U/ml in 10 mmol/L TrisHCl, 0,1 % Albumin)

Ella Biotech GmbH, Planegg

NB 1-83-Aptamer

Microsynth AG, Baglach – Schweiz

HD 1-22-Aptamer

Bachem AG, Bubendorf

Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC (I-1560)

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Erlangen

Faktor V Mangelplasma (gelöst in 1 ml Aqua dest)

Faktor IX Mangelplasma

Dade® Actin® FS Activated PTT Reagent

Dade® Innovin® (gelöst in 10 ml Aqua dest)

Dade® Owren´s Veronal Buffer (gebrauchsfertig)

In-house Production

Blut aus Predonation-Beutel von Blutspendern

2.1.3 Verwendete Puffer- und Gebrauchslösungen

Waschpuffer

4 g	NaCl
0,1 g	KCl
0,05 g	NaHCO ₃
0,025 g	NaH ₂ PO ₄
0,55 g	Glucose
1,75 g	BSA
Ad 500 ml	Aqua dest.
pH = 6,4	
1,5 µL	Bivalirudin

Suspensionspuffer

4 g	NaCl
0,1 g	KCl
0,05 g	NaHCO ₃
0,025 g	NaH ₂ PO ₄
0,55 g	Glucose
1,75 g	BSA
0,1 g	MgCl ₂
Ad 500 ml	Aqua dest.
pH=7,4	

ACD-Puffer

12,5 g	Na-Citrat
7,5 g	Zitronensäure
10 g	Glucose

Ad 500 ml Aqua dest.
pH=4,5

Versuchspuffer

10 mmol/L	TrisHCl
0,1 %	Albumin
10 µg/ml	Phospholipide
5 mmol/L	CaCl ₂
0,9 %	NaCl-Lösung

2.1.4 Verwendete Geräte

Thermo Scientific GmbH, Karlsruhe

Megafuge 1.0 RS

Deutsche Methrom GmbH & Co. KG, Essen

pH-Meter: 827 pH lab

Sartorius AG, Göttingen

Waage: BP 210s L

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Wasserbad: WNB 14

New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen

Ultra-low temperature freezer, -80 °C

Siemens Healthineers, Erlangen

Atellica COAG 360

Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt

xN-1000 SA-01

Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall

Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader

VELP Scientifica, Usmate - Italien

Zx3 Advanced Vortex Mixer

2.1.5 Verwendetes Gebrauchsmaterial

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

S-Monovette (9 ml)

S-Monovette EDTA K2Gel (2,6 ml)

Eppendorf AG, Hamburg

Research Plus Pipetten 2,5 µL bis 5 mL

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

PP-Microplatte 96 Well, black

Röhrchen 12 ml PS

2.2 Methodik

2.2.1 Gewinnung und Herstellung von Thrombozytenlysaten

Als Ausgangsprodukt diente frisches, in den Predonation-Beutel gesammeltes Blut von Blutspendern. Predonation-Beutel dienen als initiales Blutreservoir im Abnahmeset für Blutspender, woraus Blutproben mittels einer Monovette entnommen werden können. Für die Tests wurde das Blut in eine mit 1,6 ml ACD-Puffer befüllte 9 ml Monovette abgenommen. Zusätzlich wurde eine 2,6 ml EDTA K2Gel Monovette befüllt. Die 9 ml Monovette wurde bei 1850 g für zwei Minuten zentrifugiert. Das hierbei entstandene thrombozytenreiche Plasma (PRP) wurde mit einem Überstand von ca. 3 mm zu den festen Bestandteilen abpipetiert. Nun wurde eine Bestimmung der Thrombozytenkonzentration des EDTA-Blutes sowie des hergestellten PRP mittels Sysmex XN-1000 durchgeführt. Nachfolgend wurde das PRP für fünf weitere Minuten bei 998 g zentrifugiert. Hierdurch bildete sich ein Präzipitat der festen Bestandteile am Boden des Röhrchens. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Im Anschluss wurde das am Boden

partizipierende Pellet in 10 ml 37 °C warmem Waschpuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Plättchen mit 600 µL, auf 37 °C erwärmtem Suspensionspuffer resuspendiert. Es folgte eine erneute Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im Sysmex XN-1000. Für den Messvorgang verbraucht das Gerät ca. 100 µL der Suspension.

Von der verbliebenen Thrombozytensuspension wurden zur Lyse 499 µL mit 1 µL Triton x-100 für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das entstandene Lysat wurde, nach Zugabe von final 0,1 % Albumin, bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Bestimmung der Faktor V-Konzentration durch koagulometrische Messung

Zur koagulometrischen Bestimmung der Faktor V-Konzentration wurden 16 µl des Lysats 1:10 mit Owren's Veronal Buffer verdünnt. Im Folgenden wurden 50 µl der so entstandenen Verdünnung mit 50 µl Faktor V-Mangelplasma für 180 s inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Innovin® wurde die plasmatische Gerinnung aktiviert. Anschließend wurde vom Ansatz 210 s lang alle 500 ms eine Extinktionsmessung mit einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt. Durch die ermittelte Veränderung der Extinktion konnte mittels standardisierter Vergleichswerte die Faktor V-Konzentration in [% d. N.] berechnet werden. Im hauseigenen Labor wurde diese Messung mit dem Gerinnungsautomaten Atellica COAG 360 automatisiert durchgeführt.

2.2.3 Bestimmung der Faktor IX-Konzentration durch koagulometrische Messung

Der Gerinnungsfaktor IX (FIX) gehört nicht zu den thrombozytären Proteinen und findet sich ausschließlich im Plasma. Daher ist die FIX-Konzentration ein Indikator für die Effektivität, mit der Thrombozyten von plasmatischen Bestandteilen getrennt werden konnten. Im Thrombozyten-Lysat wurde die FIX-Konzentration koagulometrisch bestimmt. Dazu wurden 4 µl der Probe 1:10 mit Owren's Veronal Buffer verdünnt. Nach 10 s Inkubationszeit wurde der so entstandenen Lösung 1:2 Faktor IX-Mangelplasma hinzugefügt. Anschließend wurde eine Inkubationszeit von 120 s abgewartet. Danach wurden 40 µl Dade® Actin® FS Activated PTT Reagent zugefügt um die plasmatische Gerinnung zu aktivieren. Nach einer weiteren Inkubation von 180 s wurde die Extinktionsmessung gestartet. Diese wurde für 200 s bei 405 nm durchgeführt. Im

hauseigenen Labor wurde diese Messung durch einen Atellica COAG 360 automatisiert durchgeführt.

2.2.4 Enzymatische Messung der Faktor Va-Konzentration

Um die Faktor Va-Konzentration anhand seiner Aktivität zu bestimmen, wurde das Lysat in den in Abb. 3 gezeigten Einstufen-Peptid-Substrattest eingeführt.

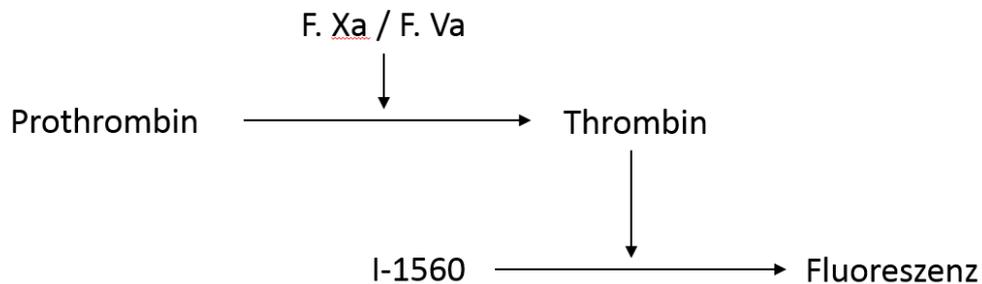


Abb. 3: Schema des Einstufen-Peptidtests. Hierbei führt eine vermehrte Faktor Va-Konzentration zu einem gesteigerten Umsatz von Prothrombin durch Faktor Xa. Das somit entstandene Thrombin setzt das fluorogene Substrat I-1560 um. Folglich lässt sich eine veränderte Extinktion messen.

Das zu bestimmenden Lysat wurde im finalen Versuchsaufbau mit Versuchspuffer 1:100 vorverdünnt. 25 µL der so entstandenen Suspension wurden mit 25 µL Prothrombin (116 nmol/L) und 25 µL I-1560 (500 µmol/L) in die Vertiefung einer schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert. Des Weiteren wurde, als Standardkurve, eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von einem Faktor Va-Ansatz (höchste Konzentration: 0,24 nmol/L) angefertigt. Diese wurde ebenfalls mit 25 µL in den gleichen Versuchsaufbau eingeführt. Durch Zugabe von 25 µL Faktor Xa (6 nmol/L) startete der enzymatische Versuch. Die Mikrotiterplatte wurde umgehend in den Microplate-Reader eingeführt. Das benutzte Programm schüttelte die Platte zunächst zehn Sekunden auf mittlerem Level und führte anschließend für 35 Minuten alle 30 Sekunden eine Fluoreszenzmessung durch. Eingestellte Optionen hierfür waren: Excitation: 360/40 nm; Emission: 460/40 nm; Optics Position: 50 %Top; Gain: 35; Read Height: 7 mm.

2.2.5 Enzymatische Messung der Faktor V-Gesamtkonzentration nach Faktor V-Aktivierung mit RVV

In der finalen Versuchsanordnung wurde 1 μL des zu messenden Lysats in 319 μL Versuchspuffer mit 0,4 U/ml RVV vorverdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 25 μL der Verdünnung mit 25 μL Prothrombin (116 nmol/L) und 25 μL I-1560 (500 $\mu\text{mol/L}$) in die Vertiefung einer schwarzen Mikrotiterplatte zusammengefügt. Die enzymatische Reaktion wurde wiederum durch Zugabe von 25 μL Faktor Xa (6 nmol/L) gestartet. Auch hier diente eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von einem Faktor Va-Ansatz (höchste Konzentration: 0,24 nmol/L) als Standardkurve. Die Mikrotiterplatte wurde umgehend in den Microplate-Reader eingefügt und mit dem unter Punkt 2.2.3 beschriebenen Programm gemessen. Die enzymatische Messung der Faktor Va-Aktivität sowie die enzymatische Messung der Faktor V-Gesamtaktivität für vier Lysate wurde nach dem in Abbildung 4 gezeigten Pipettierschema simultan ausgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
B	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
C	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
D	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
E	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
F	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
G	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○
H	●	●	○	○	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○

Abb. 4: Verwendetes Pipettierschema. Gezeigt ist die schematische Anordnung des enzymatischen Versuchs. In Spalte eins und zwei wurden jeweils Doppelwerte der halblogarithmischen Faktor Va-Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration aufgetragen. Die Werte der Zeile H bildeten hierbei einen Leerwert. In Spalte drei und vier wurden jeweils Vierfachwerte der enzymatischen Faktor Va-Bestimmung aufgetragen. In Spalte fünf und sechs wurden jeweils Vierfachwerte der enzymatischen Gesamtfaktor V-Bestimmung aufgetragen.

2.2.6 Enzymatische Messung der Faktor V-Konzentration nach Faktor Va-Inaktivierung durch aPC

In diesem Versuchsansatz wurde das Lysat zur Inaktivierung von Faktor Va mit aPC vorinkubiert. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurden dem Ansatz NB 1-83-Aptamer zugeführt um die Aktivität von aPC zu blockieren. NB 1-83 gehört neben NB2-81, NB3-82 und HS02-53G zu den von Hamedani beschriebenen DNA-Aptameren, welche die Aktivität von aPC inaktivieren. Als gemeinsames Strukturmerkmal findet sich in diesen die Region 5'-TATCMCGNATGGGS-3'. Es wird angenommen, dass diese Aptamere als allosterischer Hemmer auf aPC wirken. Crossblocking-Versuche haben gezeigt, dass alle vier Aptamere mit unfraktioniertem Heparin um dieselbe Seitenkette konkurrieren. Weiterhin konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch aPC induzierten FVa-Inaktivierung belegt werden (Hamedani et al., 2016). Nach anschließenden fünf Minuten Inkubationszeit wurden 0,4 U/ml RVV zugefügt, um verbleibenden Faktor V zu aktivieren. Durch die Zugabe von aPC, NB 1-83 und RVV wurde final eine 1:100 Verdünnung des Lysates erzielt. Nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit wurden 25 µL des Ansatzes mit 25 µL Prothrombin (116 nmol/L) und 25 µL I-1560 (500 µmol/L) auf eine schwarze Mikrotiterplatte eingebracht. Die Zugabe von 25 µL Faktor Xa (6 nmol/L) starteten wiederum die enzymatische Reaktion, welche, wie unter 2.2.3 beschrieben, gemessen wurde.

2.2.7 Enzymatische Messung der Faktor V-Gesamtkonzentration nach Aktivierung von Faktor V durch Thrombin

Das Prinzip dieses Versuchs beruhte darauf, im Lysat vorhandenen Faktor V durch Thrombin zu aktivieren. Die Zugabe einer äquimolaren Menge HD 1-22-Aptamer sollte das eingesetzte Thrombin blockieren. Das Aptamer HD1-22 vereint durch Zusammenschluss die Funktionen der Aptamere HD1 und HD22. HD1 bindet als 15 Basen großes DNA-Aptamer an die Exosite 1 von Thrombin und verhindert hierdurch die Aktivierung der Faktoren V, VIII, XI und XIII. Das Aptamer HD22 verhindert durch Bindung an die Exosite 2 die Interaktion zwischen Thrombin und thrombozytärem GP Ib/IX. Des Weiteren wird hierdurch auch die Aktivierung von FV und FVII gehindert. 25 µL des wie oben beschrieben modifizierten Lysats wurden mit 25 µL Prothrombin (116 nmol/L) und 25 µL des Substrats I-1560 (500 µmol/L) auf einer schwarzen Mikrotiterplatte

zusammenpipettiert. Des Weiteren wurde, als Standardkurve, eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von einem Faktor V_a -Ansatz (höchste Konzentration: 0,24 nmol/L) angefertigt. Diese wurde ebenfalls mit 25 μ L in den gleichen Versuchsaufbau eingeführt. Durch Zugabe von 25 μ L Faktor X_a (6 nmol/L) startete der enzymatische Versuch. Die Mikrotiterplatte wurde umgehend in den Microplatte-Reader eingeführt. Das benutzte Programm schüttelte die Platte zunächst zehn Sekunden auf mittlerem Level und führte anschließend für 35 Minuten alle 30 Sekunden eine Extinktionsmessung durch. Zur Messung wurden die unter 2.2.3 eingestellten Optionen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Testetablierung durch Vorversuche im gereinigten System

3.1.1 Nachweis der kompletten Reinigung des Lysates von plasmatischen Bestandteilen. Um zu gewährleisten, dass die in das Lysat eingehende Thrombozytensuspension von allen plasmatischen Bestandteilen befreit wurde, wurde bei drei der hergestellten Lysate sowohl FV als auch FIX koagulometrisch bestimmt. Beide Messungen wurden automatisiert mittels Atellica COAG 360 durchgeführt. Bei allen drei Lysaten lag die gemessene FIX-Konzentration unter der Nachweisgrenze. Tabelle 1 zeigt die ermittelten Messwerte der drei Lysate. Nach aktuellem Kenntnisstand liegt kein FIX in Thrombozyten vor (Ganser 2003, Preissner 2010b). Es ist daher davon auszugehen, dass die in das Lysat eingehende Thrombozytensuspension weitgehend von Plasmabestandteilen befreit ist.

Tab. 1: Koagulometrische Messung von FV und FIX. Gezeigt ist die koagulometrisch gemessene Konzentration von FV und FIX der Lysate 10-12.

Proben-ID	FV [%]	FIX [%]
Lysat 10	18,3	<0,6
Lysat 11	25,2	<0,6
Lysat 12	9,5	<0,6

3.1.2 Alleiniger Umsatz des Substrates I-1560 durch Thrombin

Folgender Versuch sollte gewährleisten, dass das im Test verwendete fluorogene Substrat I-1560 nur von entstehendem Thrombin umgesetzt wird. Hierzu wurde I-1560 mit einer finalen Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Der Umsatz durch Thrombin bzw. FXa wurde photometrisch für 30 Minuten gemessen. Die Enzyme wurden hierfür in den finalen Konzentrationen von 2,7 nmol/L , 0,85 nmol/L oder 0,27 nmol/L eingesetzt. Thrombin zeigte einen konzentrationsabhängigen Umsatz von dem Substrat I-1560. In Anwesenheit von FXa war keine signifikante Reaktion ersichtlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass FXa das fluorogene Substrat I-1560 nicht umsetzt. Abbildung 5 zeigt den konzentrationsabhängigen Fluoreszenzanstieg.

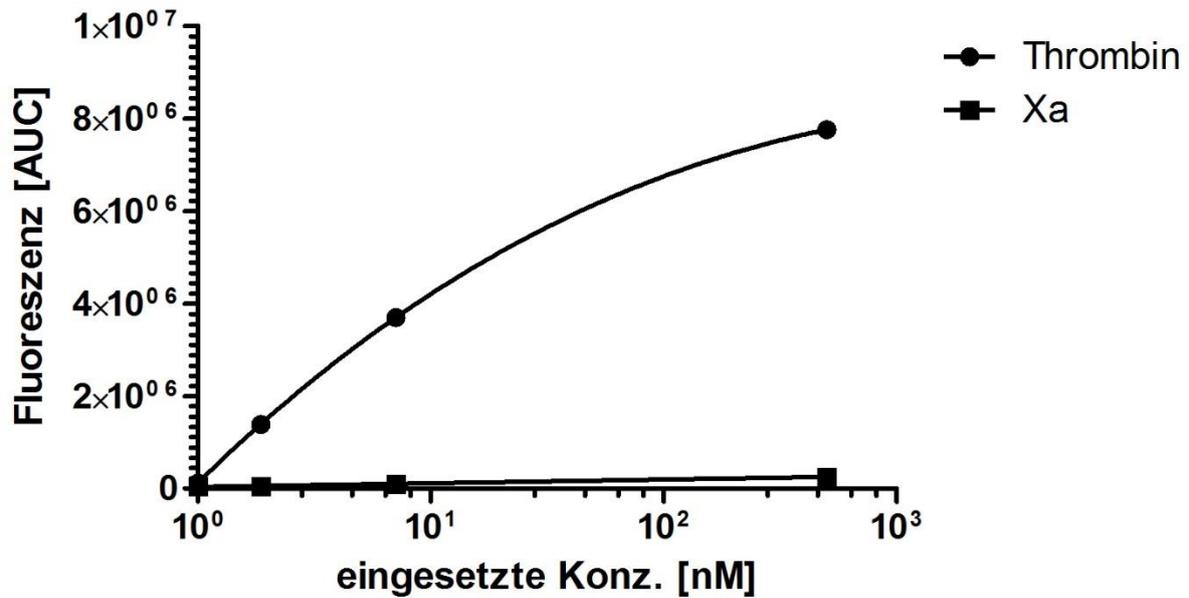


Abb. 5: Thrombin- oder FXa-vermittelte Hydrolyserate des Peptidsubstrats I-1560. Gezeigt ist die Fluoreszenzmessung nach Umsatz von I-1560 [100 µmol/L] durch verschiedene Konzentrationen von Thrombin oder F Xa. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.3 Ermittlung der im enzymatischen Test einzusetzenden FXa-Konzentration

Zur Bestimmung der geeigneten FXa Konzentration wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von FXa erstellt. Als Startkonzentration wurde 15 nmol/L gewählt. Anschließend wurde nach Vermengung mit 29 nmol/L Prothrombin der enzymatische Umsatz von 100 µmol/L I-1560 gemessen. Bei eingesetzter FXa-Konzentration von 1,5 nmol/L zeigte sich nach 30-minütiger Messung ein beginnender Fluoreszenzanstieg. Abbildung 5 zeigt die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzänderungen bei unterschiedlicher FXa-Konzentration. Die hier beschriebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf den finalen Versuchsansatz. Für die weiteren Versuche wurde FXa mit einer finalen Konzentration von 1,5 nmol/L eingesetzt. Ausschlaggebend ist hierfür der messbare, basaler Fluoreszenzumsatz. Eine FXa-Aktivierung durch FVa kann somit in größtmöglichem Umfang detektiert werden.

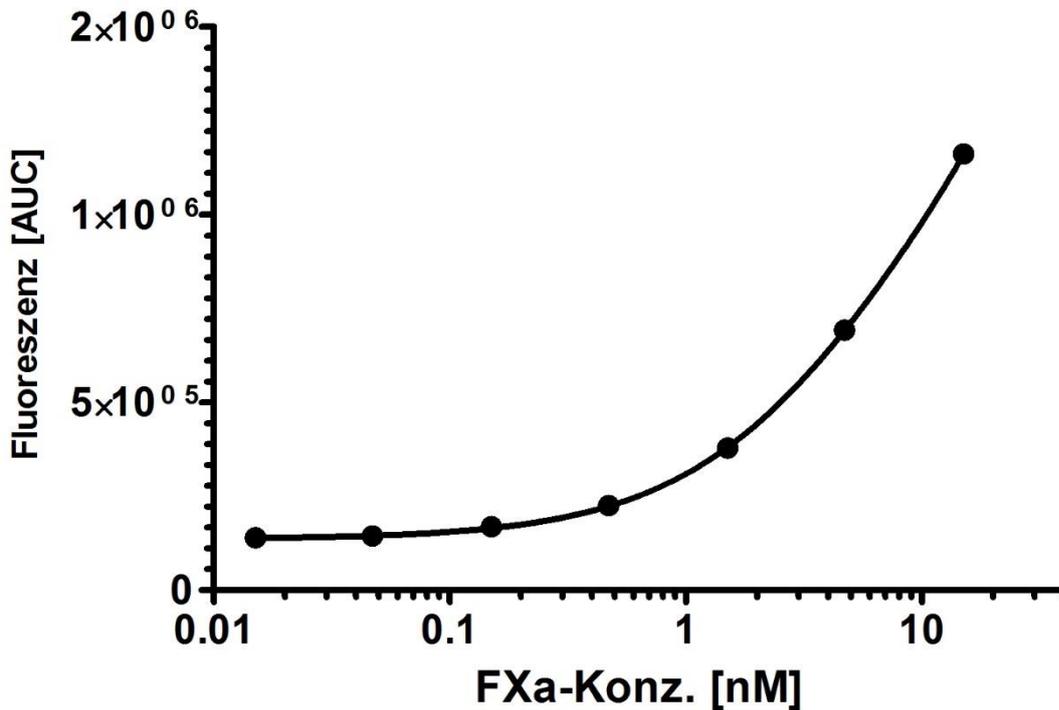


Abb. 6: Referenzkurve zur Ermittlung der FXa-Konzentration. Zeigt den Umsatz von I-1560 [100 µmol/L] durch Prothrombin [29 nmol/L] und eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von FXa bei einer Messdauer von 30 Minuten. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.4 Ermittlung der im enzymatischen Test einzusetzenden Prothrombin-Konzentration
Für den entwickelten Versuch wurde eine optimale Konzentration von Prothrombin gesucht. Diese sollte steigende FXa-Aktivität dynamisch wiedergeben ohne den Versuch mit Prothrombin zu übersättigen. Zur Ermittlung dieser einzusetzenden Prothrombin-Konzentration wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von Prothrombin angefertigt. Als höchste eingesetzte Konzentration wurden 290 nmol/L gewählt. Nach Zugabe von 1,5 nmol/L FXa und 0,06 nmol/L FVa wurde der enzymatische Umsatz von 125 µmol/L I-1560 für 30 Minuten gemessen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das finale Volumen. Wie in Abbildung 7 dargestellt, zeigte sich der dynamische Messbereich bei einer Prothrombinkonzentration von 29 nmol/L, da dies den Bereich der größten Steigung der Messkurve widerspiegelt. Resultierend wurde für alle weiteren Versuche diese Konzentration als einzusetzende Prothrombin-Konzentration gewählt.

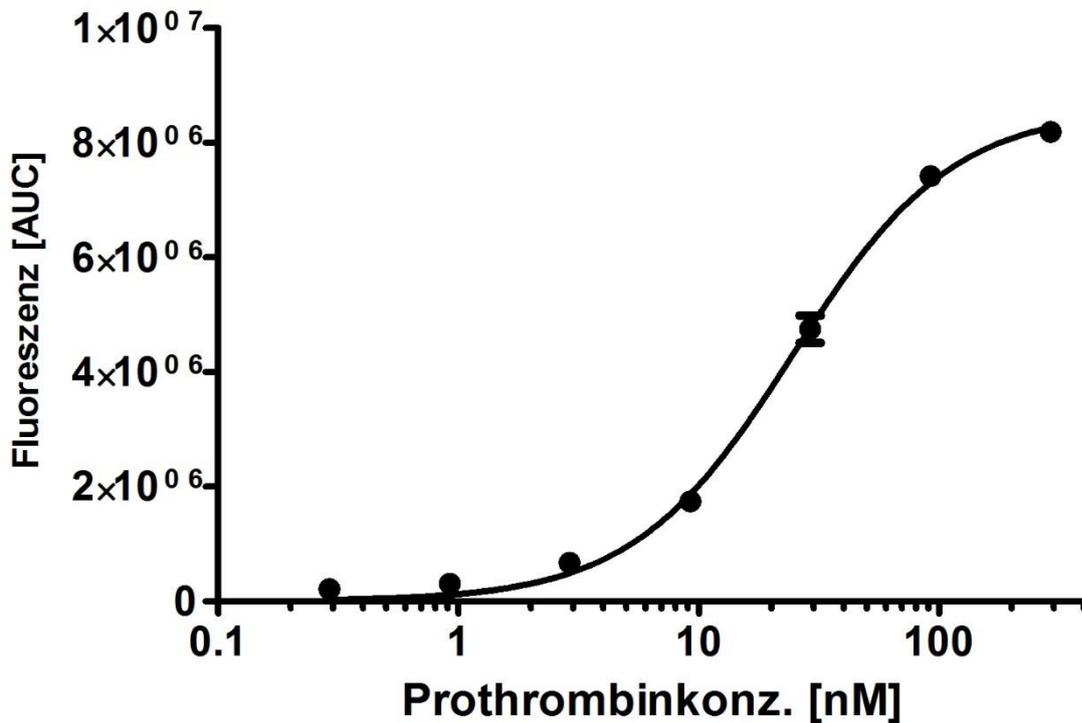


Abb. 7: Ermittlung der Prothrombinkonzentration. Gezeigt wird der Umsatz von I-1560 [125 µmol/L] durch eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von Prothrombin nach der Zugabe einer festen Konzentration von FXa [1,5 nmol/L] und FVa [0,06 nmol/L]. Die Messdauer beträgt 30 Minuten. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.5 Ermittlung einer optimalen Standardkurve von plasmatischem FVa mittels enzymatischer Messmethode

Folgender Versuch diente dazu, eine Standardkurve für plasmatischem FVa zu ermitteln. Diese sollte als Referenzwert dienen, um aus dem enzymatisch bestimmten Umsatz eines Lysates die entsprechende FVa-Konzentration zu errechnen. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von plasmatischem FVa mit einer höchsten Konzentration von 2,4 nmol/L angefertigt. Dieser wurden 100 µmol/L I-1560 und 29 nmol/L Prothrombin zugefügt. Anschließend wurde eine 30-minütige Extinktionsmessung der enzymatischen Reaktion nach Zugabe von 1,5 nmol/L FXa angefertigt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das endgültig eingesetzte Versuchsvolumen. Wie in Abbildung 8 gezeigt, bildete sich ein beginnendes oberes Plateau ab einer Konzentration von 0,06 nmol/L FVa. Für alle

weiteren Versuche wurde daher als Vergleichsstandardkurve eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von FVa mit der höchsten Konzentration von 0,06 nmol/L verwendet.

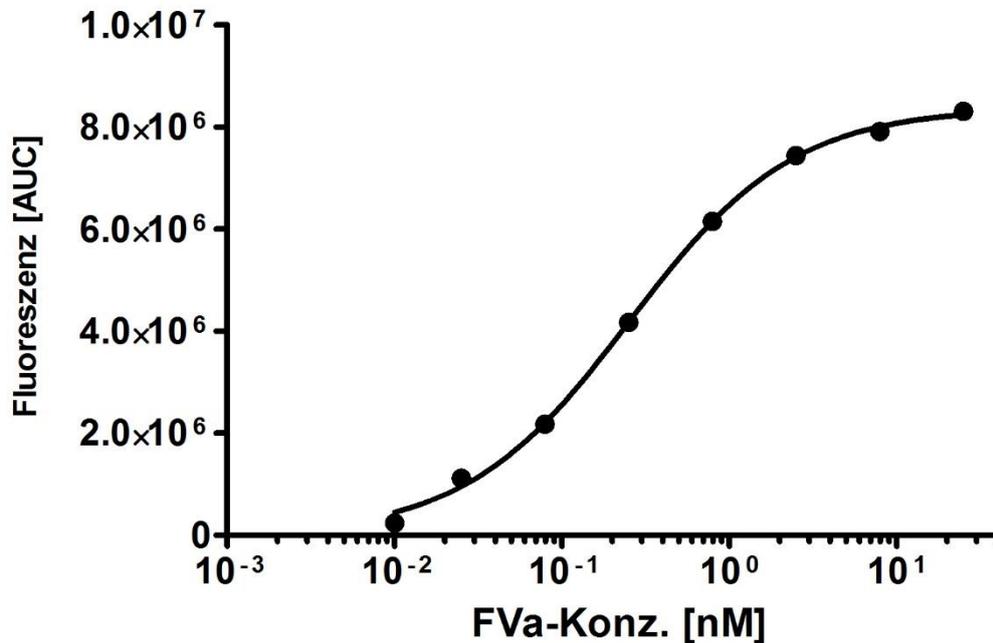


Abb. 8: Ermittlung der FVa-Standardkurve. Gezeigt ist der Umsatz von I-1560 [100 µmol/L] durch Prothrombin [29 nmol/L] und eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von FVa nach Zugabe von FXa [1,5 nmol/L] bei einer Messdauer von 30 Minuten. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.6 Ermittlung der einzusetzenden Lysatverdünnung bei enzymatischer FVa-Bestimmung

Zur Bestimmung der einzusetzenden Lysatverdünnung wurden drei Lysate mit unterschiedlicher FVa-Aktivität gewählt. Die entsprechend koagulometrisch gemessene Gesamtaktivität der einzelnen Lysate betrug 62,7 %, 46,1 % und 144,6 %. Von den ausgewählten Lysaten wurde eine 1:5 Verdünnung mit Versuchspuffer angefertigt. Ausgehend von diesen Ansätzen wurde jeweils eine halblogarithmische Verdünnungsreihe angefertigt. Anschließend wurde, bezogen auf das endgültige Volumen, 1,5 nmol/L FXa, 29 nmol/L Prothrombin und 100 µmol/L I-1560 hinzugefügt. Hierdurch wurde eine weitere 1:4 Verdünnung des Lysates erzielt. Der enzymatische Umsatz wurde anschließend mittels Extinktionsmessung für 30 Minuten gemessen. Wie in Abbildung 9 gezeigt, wurde in geringem Verdünnungsbereich das Substrat I-1560 nicht

umgesetzt. Weiterhin zeigte sich ein dynamischer, verdünnungsechter Bereich bei einer Lysatverdünnung zwischen 1:50 und 1:500. Die Konzentrationsbestimmung aller Lysate sollte, auch bei unterschiedlicher FVa Konzentration, in einem Aktivitätsbereich stattfinden, welcher im dynamischen Bereich des enzymatischen Tests liegt. Daher wurde zur enzymatischen Bestimmung der FVa-Konzentration die Vorverdünnung aller Lysate auf 1:100 festgelegt.

Abb. 9: Ermittlung der Lysatverdünnung. Gezeigt ist der Umsatz von I-1560 [100 $\mu\text{mol/L}$] durch FXa [1,5 nmol/L] und Prothrombin [29 nmol/L] bei Zugabe einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe von drei Lysaten unterschiedlicher, koagulometrisch bestimmter FV-Gesamtaktivität. Die Messdauer beträgt 30 Minuten. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.7 Kontrolle auf Aktivitätsverlust durch Lagerung des Lysats bei -80°C

Zur Bestimmung von möglichen Veränderungen der Enzymaktivität nach Kühlung auf -80°C , wurde ein Testlysat mit einer koagulometrisch gemessenen Aktivität von 74,1 % verwendet. Im Versuchsaufbau wurde ein Teil des Lysates direkt nach der koagulometrischen Messung der enzymatischen Aktivitätsbestimmung zugeführt. Die restlichen Teile wurden zu je 50 μL bei -80°C eingefroren. Das eingefrorene Lysat wurde nach sieben, acht und neun Tagen erneut gemessen. Zur Messung des enzymatischen Umsatzes wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von einer 1:5 Vorverdünnung des Lysates angefertigt. Nach Zugabe von 1,5 nmol/L FXa, 29 nmol/L Prothrombin und 100 $\mu\text{mol/L}$ I-1560 wurde die Fluoreszenzveränderung für 30 Minuten gemessen. Die beschriebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Volumen des finalen Versuchsansatzes. Wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigte das gemessene Lysat auch nach sieben und acht Tagen Lagerung bei -80°C eine Reproduzierbarkeit der Messergebnisse ohne signifikanten Aktivitätsabfall.

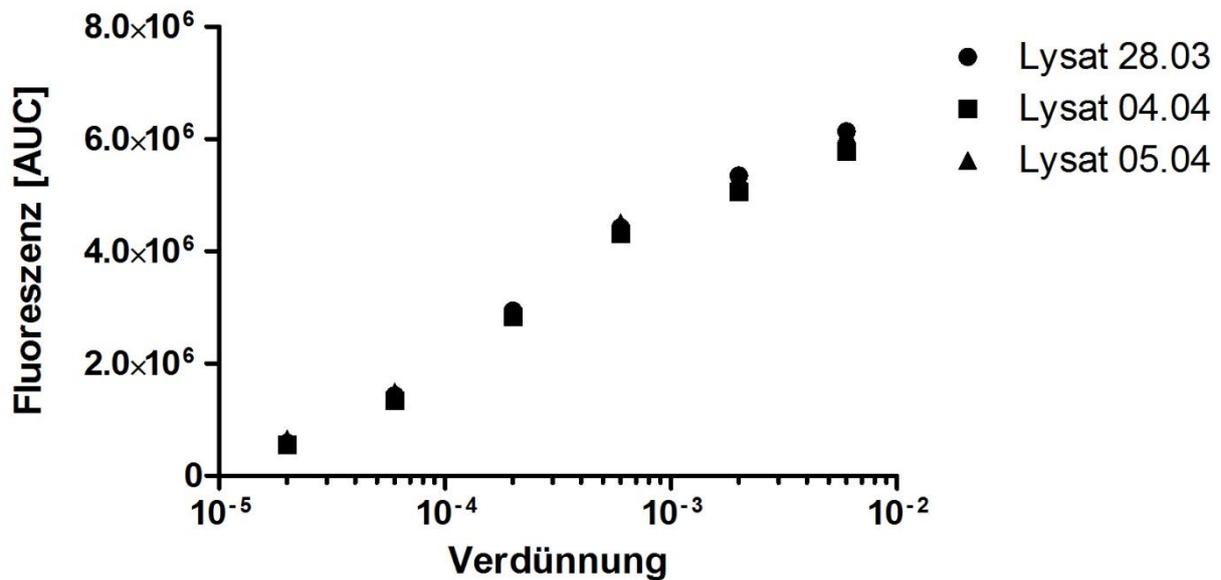


Abb. 10: Lysataktivität nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zeigt die durch enzymatische FVa-Bestimmung gemessene Aktivität eines Lysates direkt nach Herstellung (28.03) sowie nach sieben (04.04) und acht (05.04) Tagen Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.8 Hemmung der durch Thrombin vermittelten FV-Aktivierung

Im eingesetzten enzymatischen Testverfahren dient die Aktivitätsbestimmung von entstehendem Thrombin als Parameter zur indirekten Bestimmung von FVa. Da im Thrombozytenlysate vorhandener FV durch Thrombin enzymatisch aktiviert werden kann, könnten im Testverfahren falsch hohe FVa-Konzentrationen gemessen werden. Folgender Versuchsaufbau sollte eine Aktivierung von FV durch entstehendes Thrombin überprüfen. Hierfür wurde eine Mischung aus FVa und FV im Verhältnis 100 %/0 %, 60 %/40 %, 30 %/70 %, 20 %/80 %, 10 %/90 %, 5 %/95 % und 0 %/100 % eingesetzt. Es wurde in jedem Ansatz eine gemeinsame Gesamtkonzentration von 0,02 nmol/L eingesetzt. In einem parallelen Ansatz wurde in der eingesetzter FV durch Versuchspuffer ersetzt. Nach Zugabe von Prothrombin mit 29 nmol/L, I-1560 mit 100 $\mu\text{mol/L}$ und FXa mit 1,5 nmol/L wurde die Enzymreaktion über eine Extinktionsmessung über 30 Minuten erfasst. Hier angegebene Konzentrationen beziehen sich auf das Volumen des finalen Versuchsansatz. Der Austausch von FV durch Versuchspuffer hat in der gegebenen Versuchsanordnung keinen Aktivitätsunterschied aufgezeigt. Es ist daher davon

auszugehen, dass im Versuchsaufbau die Thrombin induzierte Aktivierung von Faktor V inhibiert wird.

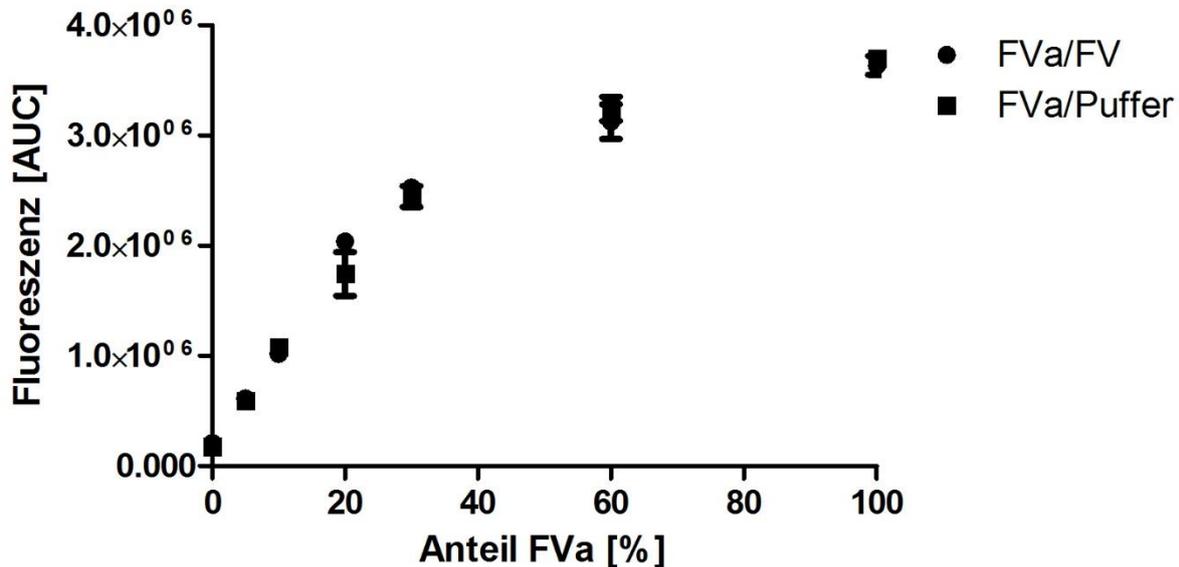


Abb. 11: Inhibition der thrombinabhängigen FV-Aktivierung. Zeigt den Umsatz von I-1560 [100 $\mu\text{mol/L}$] durch Prothrombin [29 nmol/L] und FXa [1,5 nmol/L] bei Zugabe von einem FVa/FV-Gemisch. Die eingesetzte FVa/FV-Gesamtkonzentration betrug 0,02 nmol/L . Der darin vorhandene Anteil an FVa variierte wie angegeben. In einer Vergleichskurve wurde der Anteil an FV durch Puffer ersetzt. Die Messdauer betrug 35 Minuten. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.9 Ermittlung der in der Gesamt-FV-Bestimmung eingesetzten RVV-Konzentration

Zur Ermittlung der einzusetzenden RVV-Konzentration wurden parallel drei verschiedene Versuchsanordnungen eine halblogarithmische Verdünnungsreihe RVV mit der höchsten Konzentration von 10 U/mL angefertigt. Dem ersten Ansatz wurden FVa [0,06 nmol/L] zugefügt, dem zweiten Ansatz FV [0,06 nmol/L]. Im dritten Ansatz wurde fehlendes Volumen durch Versuchspuffer ersetzt. Jede der drei Testreihen wurden für zehn Minuten anschließend inkubiert. Durch Zugabe von [1,5 nmol/L] FXa, [29 nmol/L] Prothrombin und [100 $\mu\text{mol/L}$] I-1560 wurde die enzymatische Reaktion gestartet und für 30 Minuten einer Extinktionsmessung unterzogen. Die beschriebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf das endgültige Volumen. RVV zeigt im Versuchsansatz mit eingesetztem Versuchspuffer keine signifikante Aktivitätssteigerung. Wie Abbildung 12 zeigt, erfolgte bei vorhandenem RVV eine Aktivierung von FV mit entsprechender Steigerung der

Enzymaktivität. Bei einer RVV-Konzentration von 0,1 U/mL konnte eine ausreichende Aktivierung von FV erreicht werden, die der der äquimolaren Menge FVa entspricht. Für alle weiteren Versuche wurde daher diese RVV-Konzentration verwendet.

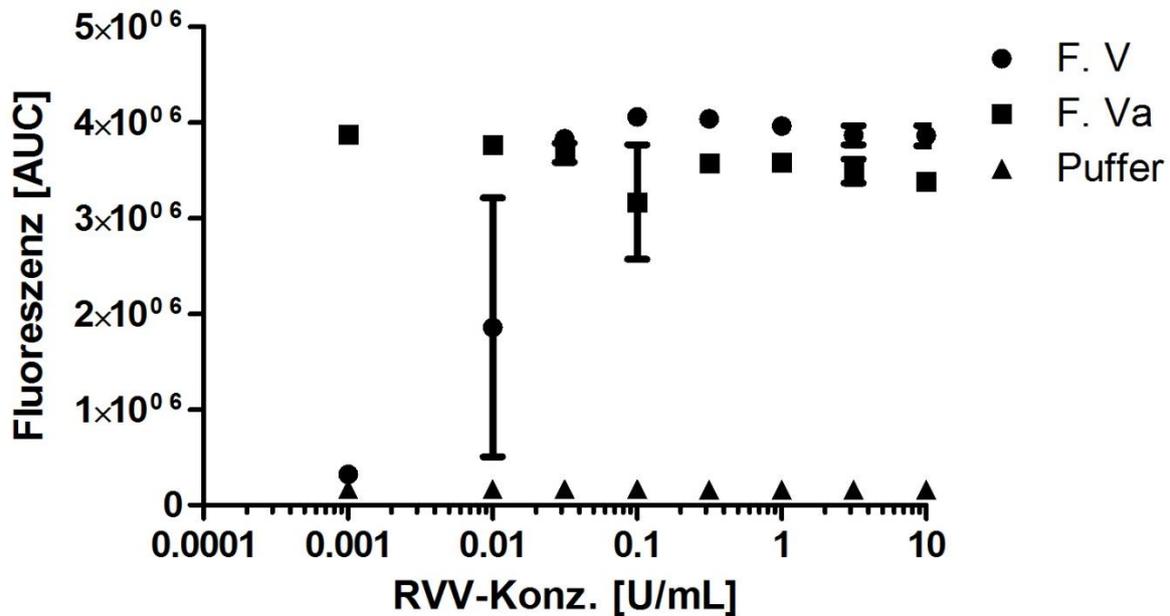


Abb. 12: Ermittlung der RVV-Konzentration. Es erfolgten drei parallele Ansätze mit FV [0,06 nmol/L], FVa [0,06 nmol/L] oder Versuchspuffer und jeweils 10-minütiger Inkubation mit einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe von RVV [10 U/ml]. Gezeigt ist die anschließende Aktivitätsmessung nach Zugabe von I-1560 [100 µmol/L], FXa [1,5 nmol/L] und Prothrombin [29 nmol/L] bei einer 30-minütigen Messdauer. Angabe von Mittelwerten.

3.1.10 Ermittlung des optimalen aPC-Inaktivators

Um eine bestmögliche aPC-Inaktivierung zu gewährleisten, wurden zwei verschiedene Aptamere auf ihre Aktivität unter gegebenen Testbedingungen überprüft. Anfänglich wurde hierfür Verdünnungsreihen von den Aptameren NB1-83 und HS02-53G mit einer Startkonzentration von jeweils 100 nmol/L angefertigt. Diese wurden für zehn Minuten mit APC [0,06 nmol/L] inkubiert. Anschließend wurde FVa [0,06 nmol/L] zugefügt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation wurde nach Zugabe von Prothrombin [29 nmol/L], I-1560 [100 µmol/L] und FXa [1,5 nmol/L] eine 30-minütige Extinktionsmessung durchgeführt. Alle genannten Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Volumen des finalen Versuchsansatzes. NB1-83 zeigte durch eine konzentrationsabhängige Inaktivierung von APC einen Ansteigenden Umsatz von I-1560. HS02-52G zeigte auch in hoher

Konzentration keine Auswirkung auf die aPC-bedingte Inaktivierung von FVa. Die genannten Aktivitätsunterschiede sind in Abbildung 13 dargestellt. Für alle folgenden Versuche wurde das Aptamer NB1-83 in einer Konzentration von 100 nmol/L verwendet.

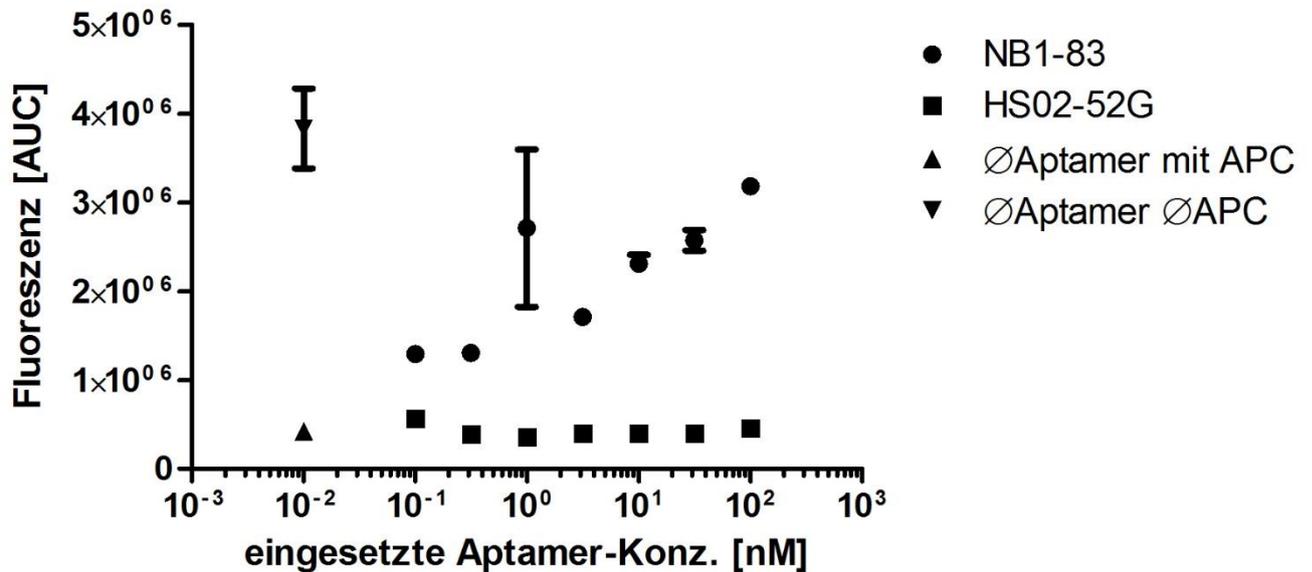


Abb. 13: Auswirkungen der Aptamere NB1-83 und HS02-52G auf die aPC-Aktivität. Zeigt den gemessenen Umsatz von I-1560 [100 µmol/L] durch FX [1,5 nmol/L], Prothrombin [29 nmol/L] und FVa [0,06 nmol/L] in Anwesenheit von aPC [0,06 nmol/L] und einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe von NB1-83 [100 µmol/L] oder HS02-52G [100 µmol/L]. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.11 Auswirkungen von aPC auf thrombozytären FV

Diese Versuchsreihe sollte die Auswirkungen von aPC auf FV und FVa darstellen. Hierfür wurde in zwei Versuchsreihen FV oder FVa mit einer Konzentration von jeweils 0,02 nmol/L für zehn Minuten mit 0,06 nmol/L aPC inkubiert. Anschließend wurde aPC durch Zugabe von 100 nmol/L NB1-83 inaktiviert. Als vergleichende Negativkontrolle wurde in zwei parallelen Ansätzen aPC durch Versuchspuffer ersetzt. Folgend wurde den Ansätzen 0,1 U/mL RVV zugesetzt, um eine Aktivierung von vorhandenem FV zu erreichen. Nach zehn Minuten wurden 29 nmol/L Prothrombin, 100 µmol/L I-1560 und 1,5 nmol/L FXa zugefügt und eine umgehende Fluoreszenzmessung für 30 Minuten durchgeführt. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Volumen des endgültigen Testansatzes. Wie in Abbildung 14 erkenntlich, verringert sich in Anwesenheit von aPC sowohl die Aktivität von FVa als auch die Aktivität von FV auf ein Minimum.

Schlussfolgernd kann wegen der aktivitätssenkenden Auswirkung von aPC auf FV durch diesen Versuchsansatz keine genaue Aussage über die FV-Konzentration getroffen werden. Der Versuchsansatz wurde deswegen verworfen.

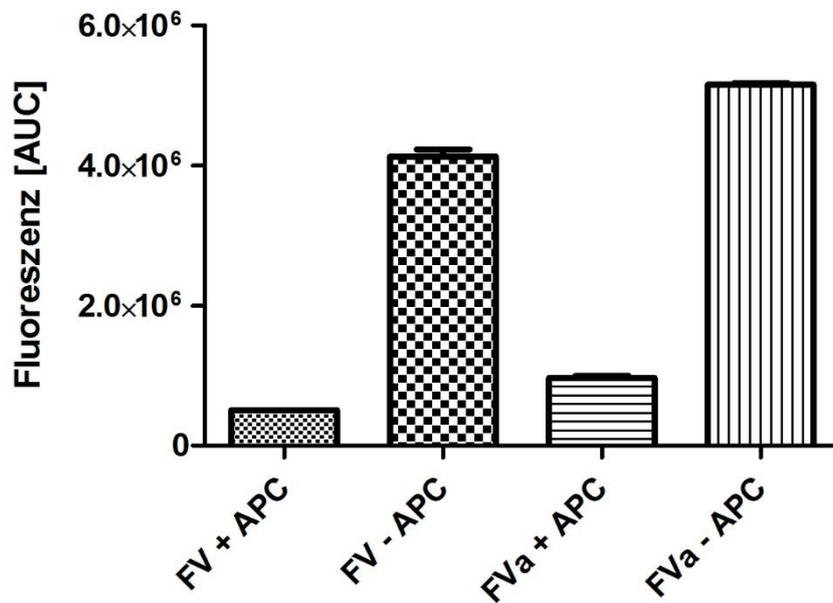


Abb. 14: Auswirkung von aPC auf FV. Zeigt die im Versuch gemessene Aktivität 100 $\mu\text{mol/L}$ I-1560 nach Umsatz durch 29 nmol/L Prothrombin, 1,5 nmol/L FX und 0,02 nmol/L FV oder 0,02 nmol/L FVa.. Eingesetzter FV/FVa wurde zuvor für 10 Minuten mit 0,06 nmol/L aPC. Die aPC-Aktivität wurde anschließend mit 100 nmol/L NB1-83 inhibiert. Darstellung von Mittelwerten bei einer Messdauer von 30 Minuten.

3.1.12 Auswirkungen von FXa auf im Lysat vorhandenen thrombozytären FV

In beiden enzymatischen Nachweismethoden wurde FXa eingesetzt. Dieser zählt zu den Aktivatoren von thrombozytärem FV. Folgender Versuch untersucht die Auswirkungen von verwendetem FXa auf im Lysat vorhandenen Plättchen-assoziierten FV. Es wurde hierfür eine 1:320 Verdünnung eines Testlysats verwendet. Das Lysat wurde im ersten Ansatz für zehn Minuten mit 0,1 U/mL RVV vorinkubiert. Zu Reaktionsbeginn wurde dem Lysat dann 1,5 nmol/L FXa zugefügt. Im zweiten Ansatz wurde das Lysat für zehn Minuten mit 1,5 nmol/L FXa vorinkubiert. Zu Reaktionsbeginn wurde kein weiterer FXa zugefügt. Im dritten Ansatz wurde dem Lysat erst mit Testbeginn 1,5 nmol/L FXa zugeführt. Alle drei Ansätze wurden vor Reaktionsstart mit Prothrombin [29 nmol/L] und I-1560 [100 $\mu\text{mol/L}$] versetzt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das endgültige Volumen.

Der enzymatische Umsatz wurde für 30 Minuten gemessen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigte sich ein Aktivitätsanstieg durch zehn Minuten Vorinkubation mit FXa im Vergleich zu direkter Zugabe von FXa bei Reaktionsstart. Nach Vorinkubation mit RVV konnte jedoch der größte enzymatische Umsatz gemessen werden. Von einer Aktivierung von im Lysat vorhandenem thrombozytärem FV durch im Test verwendeten FXa muss daher ausgegangen werden.

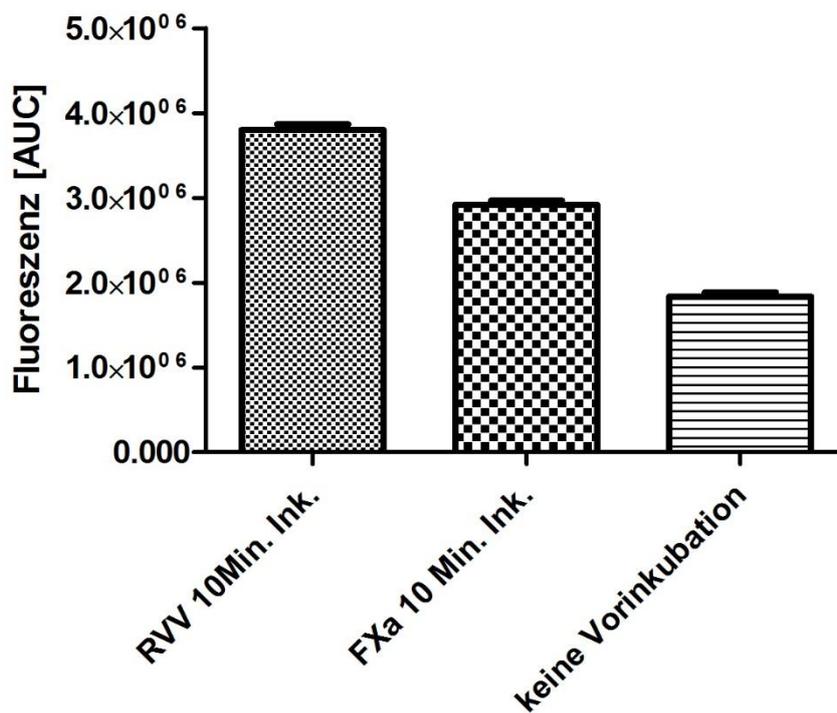


Abb. 15: Aktivierung von in Lysat vorhandenem thrombozytärem FV durch FXa. Zeigt die unterschiedlich gemessenen Aktivitäten eines Lysates nach Vorinkubation mit 0,1 U/mL RVV, 1,5 nmol/L FXa oder ohne Vorinkubation. Die 30-minütige Messung erfolgte nach Zugabe von 29 nmol/L Prothrombin und 100 µmol/L I-1560. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.13 Bestimmung der Relevanz einer Aktivierung von im Lysat vorhandenem FV durch FXa im verwendeten Versuchsaufbau

Um zu überprüfen, in wie weit der im Versuch verwendete FXa Auswirkungen auf den im Lysat vorhandenen FV hat, wurde eine Bestimmung der FVa- und Gesamt-FV-Konzentration mit drei unterschiedlichen FXa-Konzentrationen durchgeführt. Hierzu

wurde zur FVa Bestimmung eine 1:100 Verdünnung des Testlysats angefertigt. Zur Bestimmung der Gesamt-FV-Konzentration wurde parallel eine 1:320 Verdünnung des gleichen Lysates für 10 Minuten mit 0,1 U/mL RVV vorinkubiert. Von beiden Verdünnungen wurden drei parallele Ansätze erstellt. Diesen wurde jeweils Prothrombin [29 nmol/L] und I-1560 [100 µmol/L] zugefügt. Durch Zugabe von FXa in den Konzentrationen 4,74 nmol/L, 1,5 nmol/L oder 0,47 nmol/L wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Anschließend wurde umgehend eine 30-minütige Extinktionsmessung durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von FVa mit einer Startkonzentration von 0,2 nmol/L für jede FXa-Konzentration mitgeführt. Die beschriebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf das endgültige Versuchsvolumen. Abbildung 16 zeigt die durch den Versuch ermittelten FVa-Konzentrationen. Es wird davon ausgegangen, dass der im Versuch eingesetzte FXa bei gegebener Inkubationszeit keine relevante Auswirkung auf die gemessenen FVa-Konzentrationen hat.

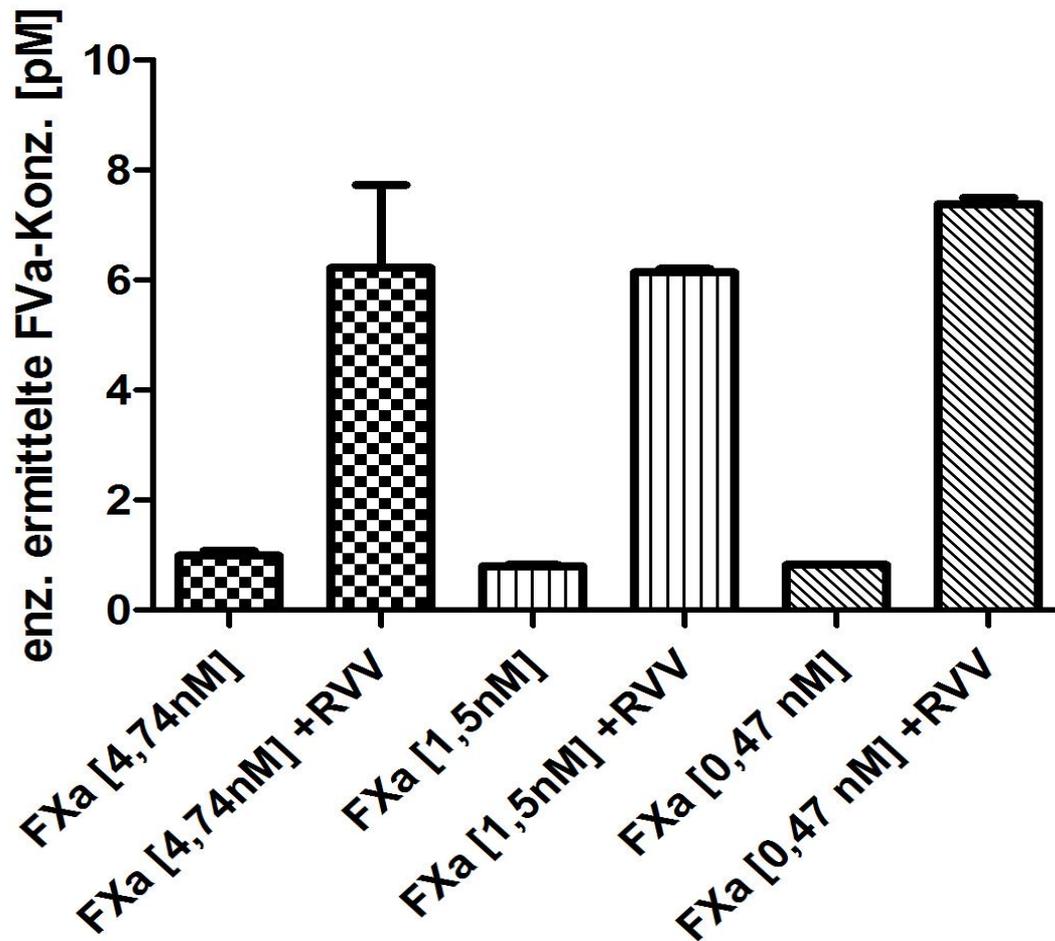


Abb. 16: Einfluss versch. FXa-Konzentrationen auf den Testansatz. Gezeigt ist die enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration und die durch 10-minütige Vorinkubation mit RVV [0,1 U/ml] ermittelte Gesamt-FVa-Konzentration. Diese wurde bei drei im etablierten Testansatz unterschiedlichen FXa-Konzentration durchgeführt. Darstellung von Mittelwerten.

3.1.14 Vortest zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Variabilität der enzymatischen Versuche

Dieser Versuch diente zur Überprüfung der Variabilität und Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Nachweisverfahren. Hierfür wurden von drei Lysaten mit unterschiedlicher FV/FVa-Konzentration an drei aufeinander folgenden Tagen mit den etablierten enzymatischen Tests jeweils Vierfachwerte bestimmt. Die koagulometrisch bestimmte FV-Konzentration der Lysate betrug 62,7 [% d. N.], 50,9 [% d. N.] und 4,6 [% d. N.]. Von jedem der Lysate wurde eine 1:100 und eine 1:320

Verdünnung angefertigt. Der 1:320 Verdünnung wurde RVV mit einer Konzentration von 0,1 U/ μ L, bezogen auf das finale Volumen, zugefügt. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurde beiden Verdünnungen Prothrombin mit bezogen auf das finale Volumen 29 nmol/L, FXa mit im endgültigen Ansatz 1,5 nmol/L und I-1560 mit bezogen auf das Gesamtvolumen 100 μ mol/L zugefügt. Durch diese Zugabe wurde eine weitere 1:4 Verdünnung der Lysate erzielt. Anschließend wurden die Vierfachwerte jeweils einer 30-minütigen Fluoreszenzmessung unterzogen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine nach 3.1.5 ermittelte FVa-Standardkurve mitgeführt. Tabelle 2 zeigt die hierbei ermittelten Konzentrationen und daraus bestimmten CV-Werte.

Tab. 2: Reproduzierbarkeit und Variabilität. Zeigt die berechnete Intra-Prozessvariabilität der enzymatischen FVa- und gesamt FV- Konzentrationsbestimmung mit den jeweilig berechneten Konzentrationen für die Lysate 62,7 [% d. N.], 50,9 [% d. N.] und 4,6 [% d. N.].

Lysat [% d. N.]	Berechnete CV (FV) in [%]	Ermittelte FV-Konz. in [nmol/L]	Berechnete CV (FVa) in [%]	Ermittelte FVa-Konz. in [nmol/L]
62,7	14,3	3,4	31,1	24,7
50,9	13,6	4,4	23,1	21,2
4,6	3,9	0,4	12,6	5,9

3.2 Ergebnisse der Messungen mit entwickeltem Testverfahren

3.2.1 Anreicherung von Thrombozyten aus gewonnenem Blut

Als Ausgangsmaterial wurde das Blut von 17 männlichen und 10 weiblichen Probanden verwendet. Die durchschnittlich gemessene Thrombozyten-Konzentration des ursprünglichen Vollbluts betrug hierbei 242.000 / μ L +/- 64.000 / μ L. Nach Herstellung von plättchenreichem Plasma durch Zentrifugation wurde eine durchschnittliche Konzentration der Thrombozyten mit 305.000 / μ L +/- 120.000 / μ L ermittelt. Nach wie in 2.2.1 beschreiben vollständig durchgeführter Anreicherung konnte in der finalen Thrombozytensuspension eine Thrombozytenkonzentration von 569.000 / μ L +/- 273.000 / μ L gemessen werden. Die Effizienz der Anreicherung von Thrombozyten zeigt eine positive Korrelation mit der ursprünglichen Konzentration im Vollblut. Abbildung 17 zeigt die in diesem Verfahren gemessenen Thrombozytenkonzentrationen.

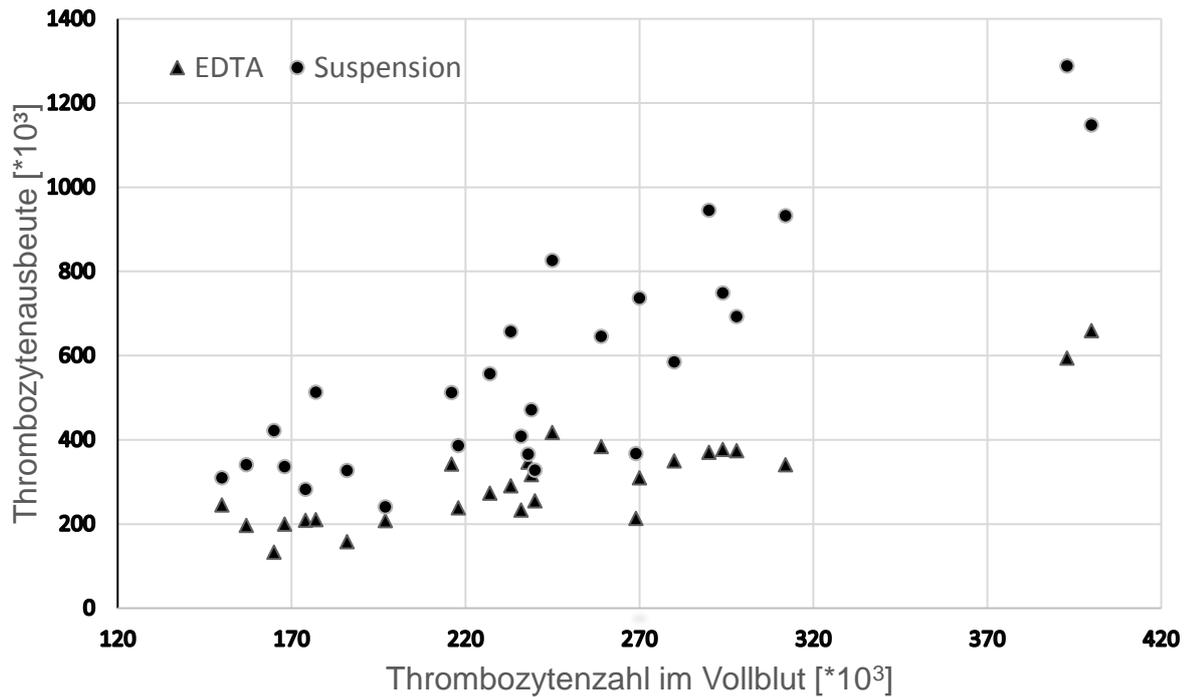


Abb. 17: Anreicherung der Thrombozyten durch Waschvorgang. Gezeigt sind die gemessenen Thrombozytenkonzentrationen von PRP und der in das Lysat eingegangenen Thrombozytensuspension nach beenden der Anreicherung bei entsprechendem Ausgangswert der Thrombozytenkonzentration im Vollblut.

3.2.2 Koagulometrisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration

Die koagulometrische FV-Konzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte mit der unter 2.2.2 beschriebenen Methode. Hierbei wurde eine durchschnittliche Gesamtaktivität von 30,6 % +/- 28 % erzielt. Unter Berücksichtigung der eingehenden Thrombozytenkonzentrationen lässt sich hieraus eine durchschnittliche FV-Gesamtkonzentration von $0,87 \mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8\text{PLT} \pm 0,4 \mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8\text{PLT}$ berechnen. Abbildung 18 zeigt die hierbei ermittelten FV-Konzentrationen.

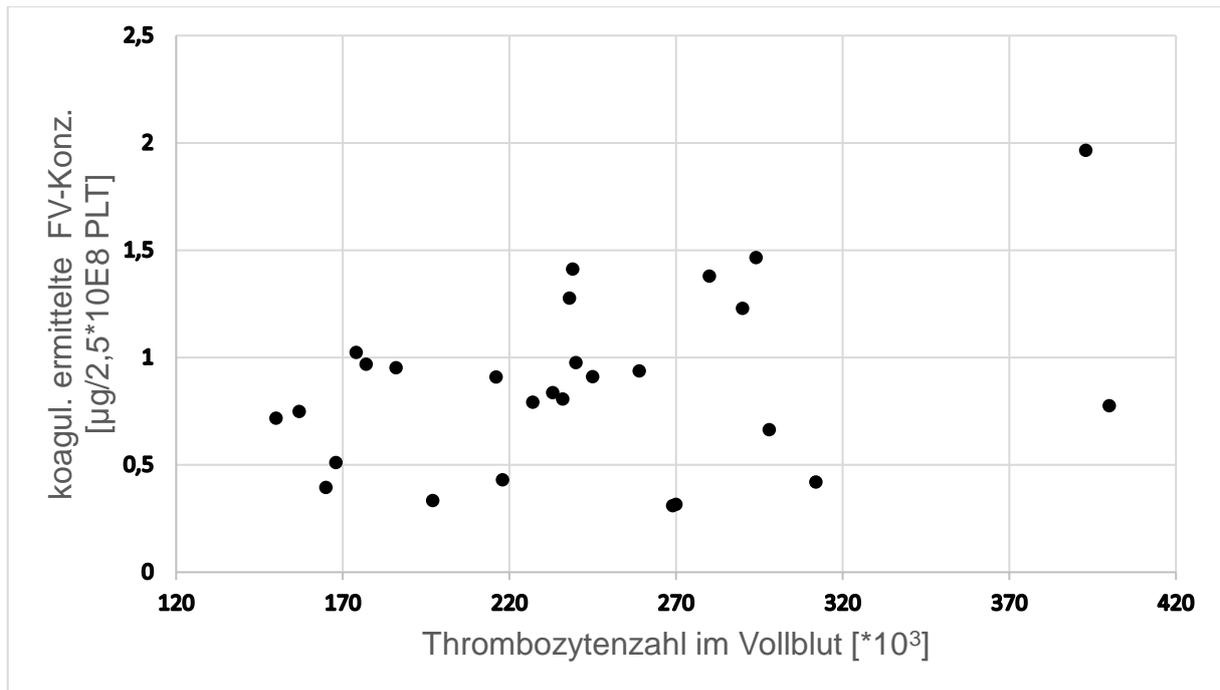


Abb. 18: Koagulometrisch ermittelte FV-Konzentration. Zeigt die koagulometrisch ermittelte FV-Konzentration pro $2,5 \cdot 10^8$ Thrombozyten im Verhältnis zur ursprünglichen Thrombozytenkonzentration im Vollblut.

3.2.3 Enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration

Von den gewonnenen Lysatproben wurde eine unter 2.2.3 beschriebene enzymatische Bestimmung der FVa-Konzentration durchgeführt. Die hierbei ermittelte durchschnittliche FVa-Konzentration betrug $1,17 \mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8 \text{ PLT} \pm 0,87 \mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8 \text{ PLT}$. Abbildung 19 zeigt die enzymatisch ermittelten FVa-Konzentrationen.

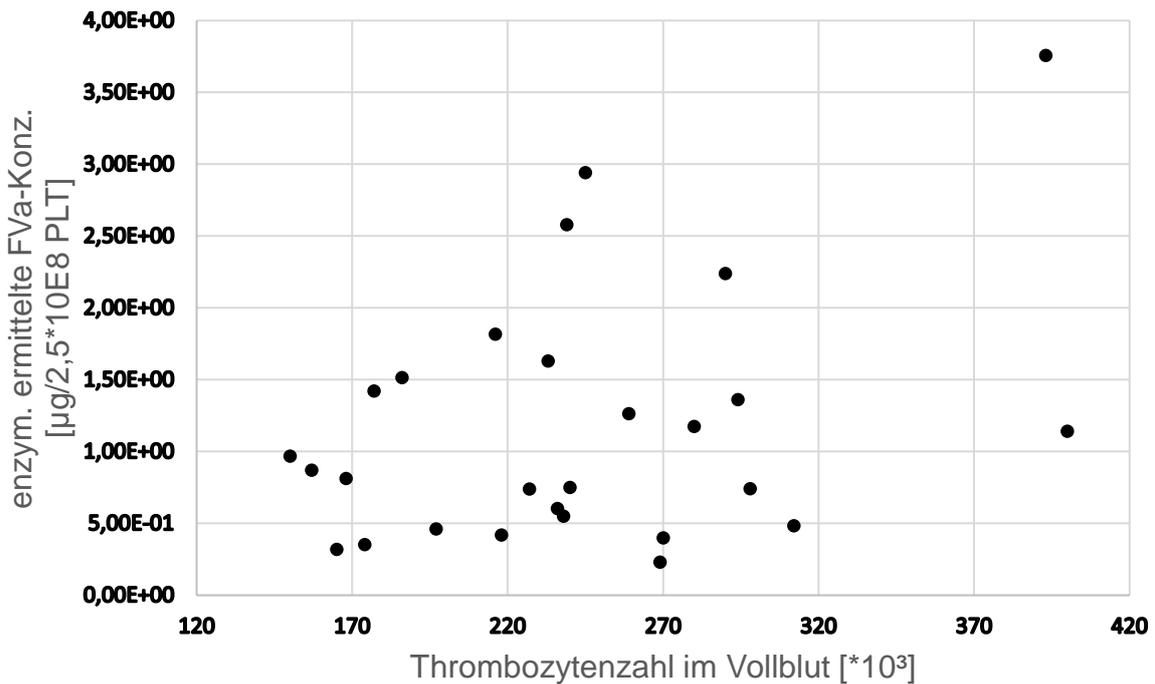


Abb. 19: Enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration. Gezeigt sind die enzymatisch ermittelten FVa-Konzentrationen im Verhältnis zur Thrombozytenkonzentration im ursprünglichen Vollblut.

3.2.4 Enzymatisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration

Die FV-Gesamtkonzentration der hergestellten Lysate wurde wie unter 2.2.4 beschrieben enzymatisch gemessen. Durchschnittlich wurde in den Lysaten eine FV-Konzentration von 52 pmol/L +/- 33 pmol/L gemessen. Unter Berücksichtigung der in die Messung eingehenden Thrombozyten betrug die thrombozytäre FV-Konzentration 9 $\mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8 \text{ PLT}$ +/- 4 $\mu\text{g}/2,5 \cdot 10^8 \text{ PLT}$. Abbildung 20 zeigt die hierbei ermittelten FV-Gesamtkonzentrationen.

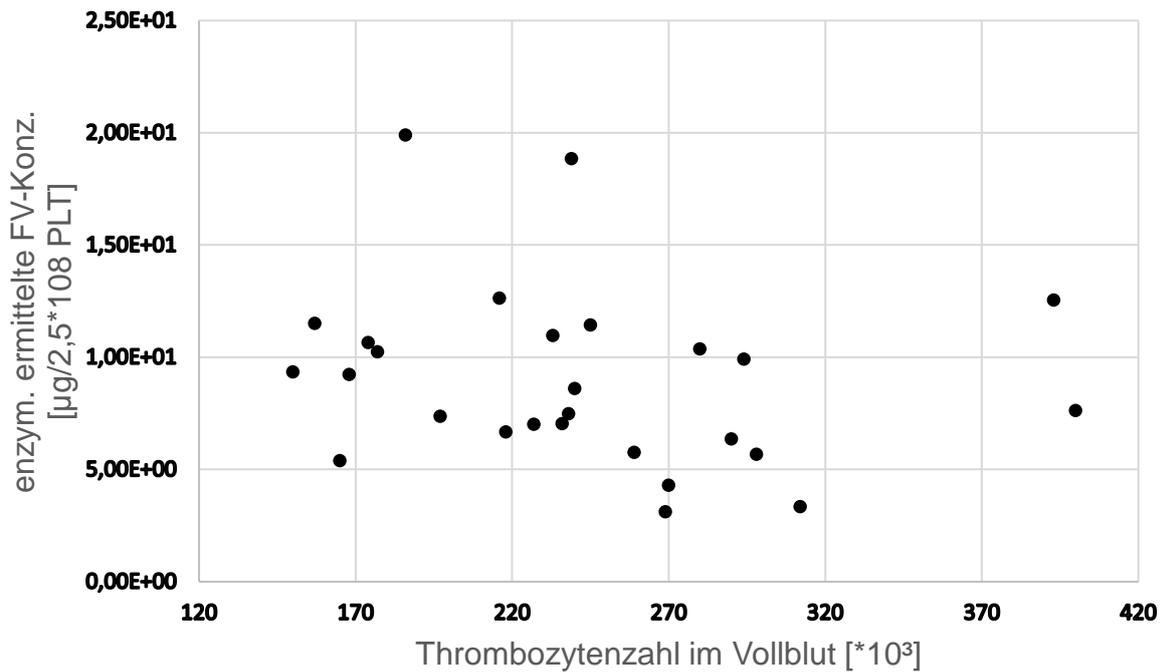


Abb. 20: Enzymatisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration. Gezeigt ist die enzymatisch ermittelte FV-Gesamtkonzentration im Verhältnis zur Thrombozytenkonzentration des ursprünglichen Vollbluts.

3.2.5 Korrelation der enzymatischen und koagulometrischen FV-Bestimmung

Ein Vergleich der beiden neu etablierten Messmethoden zeigt eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,297 bei $y=5,405x+4,3159$. Abbildung 21 stellt die Korrelation der beiden Messverfahren graphisch dar.

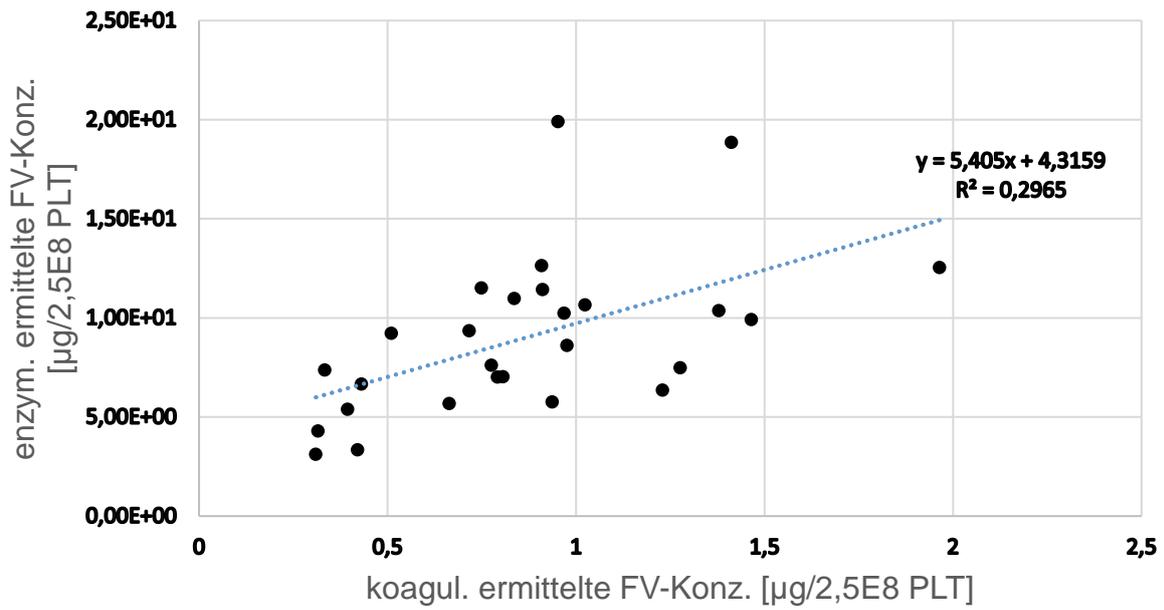


Abb. 21: Vergleich der koagulometrisch und enzymatisch ermittelten FV-Konzentrationen. Zeigt einen direkten Vergleich der enzym. und koag. ermittelten FV-Konzentrationen von den in dieser Arbeit verwendeten Lysaten.

4. Diskussion

Mit dieser Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen, standardisiert den in Thrombozyten enthaltenen FV quantitativ zu analysieren. Hierfür wurde ein entsprechendes Verfahren entwickelt, das nach Aufreinigung aus Vollblut eine alleinige Bestimmung der in Thrombozyten intrazellulär enthaltenen Gerinnungsfaktoren ermöglicht. Zur Bestimmung der FV-Aktivität wurde einerseits eine modifizierte aPTT-Messung als koagulometrischer FV-Einstufentest verwendet. Andererseits wurde in einem zweiten Messansatz ein Einstufen-Peptidtest zur enzymatischen Bestimmung der FV-Aktivität etabliert. Die enzymatische Messmethode zeigte eine gezielte Inhibition der Aktivierung von FV durch seine physiologischen Aktivatoren. Im Rahmen der Arbeit durchgeführte Versuche konnten belegen, dass die Gerinnungsfaktoren Thrombin und FXa bei den im Versuch eingesetzten Konzentrationsverhältnissen und Inkubationszeiten keine relevante aktivierende Wirkung auf FV entwickeln. Es wird hierbei eine allosterische Hemmung vermutet. Folglich konnte mit den genannten enzymatischen Testverfahren eine Aussage über das Verhältnis von inaktivem und bereits aktiviertem FV in Thrombozyten getroffen werden. Im Folgenden werden die erhaltenen Resultate diskutiert.

4.1 Vergleichbarkeit mit bisheriger Literatur

Bisherige Aussagen über die Konzentration von thrombozytärem FV sowie sein Verhältnis zu im Plasma vorkommenden FV beziehen sich auf eine Veröffentlichung von 1982 (Tracy et. al., 1982). In dieser Arbeit wurden Konzentrationsbestimmungen mittels plasmatischem FV als Standard durchgeführt. Zur Messung wurden bei Tracy et. al. zwei Methoden verwendet. Einerseits ein Radioimmunoassay, welcher mittels Antikörper die Konzentration von FV bestimmt, andererseits ein Bioassay, welcher die Aktivität von FVa misst. Für den hier eingesetzten Bioassay wurde aus Thrombozyten gewonnener FV mit Thrombin inkubiert, um ihn in seine aktive Form zu überführen. Folglich konnte die Gesamtaktivität des vorhandenen FV im Bioassay durch Vergleich mit gereinigtem, plasmatischem FVa bestimmt werden. Die hierbei ermittelte Konzentration von im Blutplasma vorhandenem FV wurde mit 4-14 µg/mL beschrieben. Die Konzentrationsbestimmung des aus Thrombozytenlysaten gewonnenem FV ergab 0,63-

1,93 μg FV pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten (entspricht 4612-14128 Molekülen FV / Thrombozyt) (Tracy et al., 1982).

In der Zwischenzeit gewonnene Erkenntnisse über FV zeigen, dass sich plasmatischer und thrombozytärer FV strukturell unterscheiden (Ayombil et al., 2013; Bouchard et al., 2005). Diese strukturellen Unterschiede könnten zu einer schlechteren Bindung der im Radioimmunoassay verwendeten Antikörper geführt haben. Folglich wäre eine falsch niedrige Konzentration des thrombozytären FV bestimmt worden. Möglicherweise wurde auch der in thrombozytärer α -Granula vorhandene, schon voraktivierte FVa durch die Antikörper nicht berücksichtigt. Um die funktionelle Aktivität im verwendeten Bioassay messen zu können, wurde vorhandener thrombozytärer FV mittels Thrombin in seine aktive Form überführt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass thrombozytärer FV, im Gegensatz zu seinem plasmatischen Gegenstück, effektiver durch FXa aktiviert werden kann (Monkovic et al., 1990 a). Die durch Tracy verwendete FV-Aktivierung mittels Thrombin könnte somit zu einer inkompletten Aktivierung aller FV-Moleküle geführt haben. Dies hätte folglich zu einer falsch niedrigeren Messung der thrombozytären FV-Konzentration geführt. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass die technischen Möglichkeiten der im Jahre 1982 verwendeten Geräte möglicherweise geringer ausfielen. Diese Grenzen der damaligen apparativen Messung könnten somit eine ungenauere Konzentrationsbestimmung verantworten. Um neuere Erkenntnisse über veränderte Eigenschaften und Struktur von thrombozytärem FV/FVa zu berücksichtigen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine Konzentrationsbestimmung durch Messung der enzymatischen Aktivität verwendet.

Vergleicht man die koagulometrisch bestimmte FV Konzentration von durchschnittlich $0,87 \mu\text{g}$ pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten mit der von Tracy gemessenen Konzentration von $0,63$ - $1,93 \mu\text{g}$ FV pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten, bestätigen die neu gemessenen Werte die angegebene Konzentration der damaligen Publikation. Die über die enzymatische Aktivitätsbestimmung gemessenen Konzentrationen zeigen jedoch auffällige Abweichungen. So wurde hierdurch eine durchschnittliche FVa-Konzentration von $1,17 \mu\text{g}$ FVa pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten und eine durchschnittliche FV-Gesamtkonzentration von $9 \mu\text{g}$ FV pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten gemessen. Es zeigt sich interessanterweise, dass die enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration der Konzentration gleicht, welche durch

die koagulometrische Messmethode gemessen bzw. von Tracy beschriebenen wurde. Hingegen zeigt sich auffällig, dass die gemessene FV-Gesamtkonzentration, bezogen auf die durch Tracy gemessene plasmatische FV-Konzentration (4-14 $\mu\text{g/mL}$), ein annähernd ausgewogenes Gleichgewicht zwischen 1mL Plasma und $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten (in 1mL durchschnittlich vorhandene Thrombozytenanzahl) aufzeigt. Eine Überprüfung der im Plasma vorhandenen FV-Konzentration durch die etablierte enzymatische Messmethode konnte allerdings nicht durchgeführt werden. Das im Blutplasma physiologisch vorhandene Prothrombin verhindert eine enzymatische FV-Bestimmung mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode. Zudem würden antikoagulatorisch wirksame Substanzen wie etwa Antithrombin dazu führen, dass die verwendete Methodik in diesem Fall nicht aussagekräftig wäre. (Levy et al., 2016)

Ein direkter Vergleich der drei Messverfahren sollte dennoch kritisch betrachtet werden. So stützt sich die durch Tracy et al. (1982) beschriebene Konzentrationsanalyse hauptsächlich auf eine durch Antikörper vermittelte Strukturerkennung von FV. Bei der in dieser Arbeit verwendeten koagulometrischen Messmethode wird wiederum die Aktivität der FV-Moleküle im Zusammenspiel mit den restlichen Komponenten im Gerinnungssystem bestimmt. Im enzymatischen Messverfahren wird die reine FV/FVa-Funktion im Prothrombinasekomplex erfasst. Um eine weitere Aussagekraft der dargelegten Werte zu gewinnen, sollte daher eine weitere strukturelle Konzentrationsbestimmung von FV (z. B. mit ELISA) unter Berücksichtigung der aktuellen Erkenntnisse über die strukturellen Unterschiede von thrombozytärem und plasmatischem FV erfolgen.

4.2 Herstellung der Thrombozytenlysate

Um eine gezielte Aussage über die Konzentration von thrombozytärem Faktor V treffen zu können, wurden Thrombozyten aus Probandenblut isoliert und mit Triton X-100 lysiert. Hierfür wurde eine modifizierte Version der von Gould und Mitarbeitern beschriebenen Methode verwendet (Gould et al., 2004). Aus Gründen der praktischen Handhabung wurde auf die Gewinnung des Blutes mittels direkter Venenpunktion verzichtet. Das für die Analyse verwendete Blut stammt aus dem Predonationbeutel von Blutspendern der im Institut ansässigen Blutspende. Es wurde mit großer Sorgfalt darauf geachtet, dass sich das Blut für eine möglichst kurze Zeit im Predonationbeutel befindet, da hier keine

Antikoagulation vorliegt. Im Rahmen der Arbeit wurden jedoch keine Bestimmungen durchgeführt, durch welche sich die gemessene FVa-Konzentration von Blut aus direkter Venenpunktion mit der gemessenen FVa-Konzentration von aus dem Predonationbeutel gewonnenen Blut desselben Probanden vergleichen ließe. Es wird davon ausgegangen, dass sich die unterschiedliche Art der Gewinnung nicht erheblich auf im Blut enthaltene Thrombozyten auswirkt. Durch die physikalische Beanspruchung insbesondere während des Reinigungsvorgangs kann eine Aktivierung der Thrombozyten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Eine Aktivierung von Thrombozyten geht mit dem Ausschütten des Inhalts der α -Granula und hiermit verbundenem Verlust von thrombozytärem FV/Va einher (Alberio et al., 2000; Li et al., 2010). Es ist jedoch zu erwarten, dass diese Verluste bei den einzelnen Entnahmen und Aufbereitungen vergleichbar waren, so dass eine zumindest relative Vergleichbarkeit der erhobenen Werte von Individuum zu Individuum gegeben war. Allerdings könnten die in dieser Arbeit berichteten Absolutwerte den tatsächlichen Wert unterschätzt haben.

4.3 Koagulometrische Gesamt-Faktor V-Bestimmung

Die hergestellten Thrombozyten-Lysate wurden einer Messung unterzogen, bei welcher über die jeweilige koagulometrische Aktivität Rückschlüsse auf enthaltenen FV erlangt werden können. Der hierfür eingesetzte FV-Einstufen-Test beruht auf der Verwendung von FV-Mangelplasma zur Bestimmung der Koagulationszeit. Folglich sind die im Lysat vorhandenen FV-Moleküle der limitierende Faktor der Messung, wodurch ein Rückschluss auf die enthaltene FV-Konzentration getroffen werden kann. Um aus den so ermittelten prozentualen Aktivitätswerten eine Konzentration zu berechnen, wurde von einer durchschnittlichen FV-Plasmakonzentration von 7 $\mu\text{g/ml}$ im gesunden Probandenkollektiv ausgegangen (M. Barthels et al., 2012). Diese wurde als im Plasma vorhandene, durchschnittliche FV-Konzentration von Tracy beschrieben (Tracy et al., 1982). Die hierbei in den Lysatproben durchschnittlich gemessene Konzentration von FV wurde mit 0,87 μg pro $2,5 \cdot 10^8$ Thrombozyten berechnet. Zur Auswertung der konzentrationsbedingten Gerinnungszeit wurde als Vergleichskurve eine Standardkurve der durchschnittlichen plasmatischen Gerinnungszeit von Blut gesunder Probanden verwendet. Plasmatischer und thrombozytärer FV zeigen jedoch ein unterschiedliches Ansprechen auf die Aktivierung durch Thrombin bzw. FXa (Gould et al., 2004). Ob sich

dementsprechend thrombozytärer FV im gleichen Maße wie sein plasmatisches Gegenstück auf die Koagulationszeit des durchgeführten Tests auswirkt, ist nicht mit gänzlicher Sicherheit gegeben. Teile der in Thrombozyten vorhandenen FV-Population sind in einem bereits aktiven Zustand vorhanden (Jeimy und Fuller, 2008). Dies könnte einen beeinflussenden Effekt auf die zu messende Zeit bis zur Koagulation und die hierdurch bestimmte Konzentration haben. Es wird vermutet, dass die zuvor aufgeführten Einflüsse der veränderten Kinetik von thrombozytärem FV keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse hat.

4.4 Versuchsansatz zur enzymatischen Faktor V-Bestimmung

Es sollte eine enzymatische Messmethode zur gezielten Bestimmung von thrombozytärem FV in seiner nicht-aktiven Form etabliert werden. Hierfür war es notwendig in der Probe vorhandenen FVa im Vorfeld zu inaktivieren, ohne vorhandenen FV auszuschalten. Im entworfenen Versuchsansatz sollte aPC vorhandenen FVa proteolytisch spalten. Nach einer anschließenden Inaktivierung von aPC durch ein aPC-inhibierendes DNA-Aptamer, sollte vorhandener FV durch RVV aktiviert und anschließend über seine Aktivität im Prothrombinase-Komplex quantifiziert werden.

Die benötigte Inaktivierung von aPC wurde durch Verwendung des von Hamedani et al. beschriebenen Aptamers NB1-83 (Hamedani et al., 2016) erzielt. Dieses konnte bei Verwendung eines 1500-fach molaren Überschusses eine für den Versuch als ausreichend erachtete Inaktivierung von aPC erzielen. Ein in dieser Arbeit durchgeführter Vorversuch über die Auswirkungen der Interaktion zwischen aPC und FV bzw. FVa hatte jedoch gezeigt, dass plasmatischer FV nach Kontakt mit aPC ebenfalls seine prokoagulatorische Aktivität verliert. Bisherige Publikationen über diese Interaktion konnten somit bestätigt werden (Segers et al., 2007; Thorelli et al., 1998; Thorelli et al., 1999). Bei Einsatz einer für die Inaktivierung von vorhandenem FVa nötigen Konzentration an aPC wurde bereits ein signifikantes Nachlassen der Aktivität von FV ersichtlich. Folglich konnte mit dem angedachten Versuchsansatz keine gezielte Aussage über die enzymatisch gemessene Konzentration von FV getroffen werden. In Thrombozyten gespeicherter FV zeigt durch seine veränderte Struktur eine erhöhte Resistenz gegen die Inaktivierung durch aPC (Rand et al., 1994). Seine Interaktion mit aPC kann daher nicht mit der seines plasmatischen Gegenstücks verglichen werden.

Gereinigter thrombozytärer FV/Va stand zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit im kommerziellen Handel jedoch nicht zur Verfügung. Gezielte Vorversuche mit thrombozytärem FV(a) bezüglich des Verhaltens in diesem Versuchsaufbau konnten daher nicht durchgeführt werden. Der Versuchsansatz wurde in Folge der hiermit verbundenen potentiellen Fehlerquellen verworfen.

4.5 Enzymatische Faktor Va-Bestimmung

Für die spezifische Ermittlung der thrombozytären FVa-Aktivität wurde ein Einstufen-Peptidtest etabliert. Dieser sollte durch enzymatische Bestimmung der aktivitätssteigernden Wirkung von FVa im Prothrombinasekomplex, ohne Rekrutierung von vorhandenem FV, eine alleinige Aussage über die Konzentration von FVa erbringen. Die durch diese Messmethode durchschnittlich ermittelte FVa-Konzentration lag bei 1,17 µg pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten.

Im Testaufbau musste gewährleistet werden, dass im Lysat vorhandener FV während des enzymatischen Testablaufs nicht durch seine physiologischen Aktivatoren Thrombin und FXa aktiviert wird, da sonst eine verfälschte FVa-Konzentration gemessen würde. Vorversuche hierzu haben gezeigt, dass bei den im Test eingesetzten Konzentrationen eine durch Thrombin vermittelte Aktivierung von plasmatischem FV inhibiert wird. Es wird hierbei von einer kompetitiven Hemmung durch überreich vorhandenes fluorogenes Substrat ausgegangen. Das eingesetzte Substrat I-1560 bindet an das aktive Zentrum von Thrombin, welches durch limitierte Proteolyse aus Prothrombin frei wird und verhindert somit eine Interaktion zwischen freiwerdendem Thrombin und FV. Die Bindung von I 1560 zu α -Thrombin wird mit einer sehr hohen Assoziation ($K_m=11 \mu\text{mol/L}$; $K_{cat}=16 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ und $K_m/K_{cat}=15000000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Kawabata et al, 1988) beschrieben. Im Gegensatz hierzu legen verschiedene Untersuchungen zur Kinetik der FV-Aktivierung durch Thrombin nahe, dass FV mit einer deutlich geringeren Affinität an Thrombin bindet. Diese Bindung wird mit $K_a = 3690 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für den Bereich FV (657-709) und $K_a = 999 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für den Bereich FV (1481-1545) beschrieben (Corral-Rodriguez et al., 2011). Bradford zeigt zudem auf, dass bei den proteolytischen Spaltungen von FV durch Thrombin eine hierarchische Abstufung der einzelnen Geschwindigkeiten zu beobachten ist. Die langsamste enzymatische Aktivität ($P_{709} > P_{1018} >> P_{1545}$) wird an der Position mit der niedrigsten Substrataffinität beschrieben (Bradford und Krishnaswamy, 2019). Ein Vergleich dieser

Beobachtungen legt den Schluss nahe, dass entstehendes Thrombin hauptsächlich das eingesetzte fluorogene Peptid umsetzt. Weitere Vorversuche konnten bestätigen, dass grundsätzlich eine Aktivierung von im Lysat vorhandenem thrombozytärem FV durch FXa möglich ist (Monkovic et. al., 1990 a). Versuche mit variierenden FXa Konzentration haben jedoch gezeigt, dass der im Versuch eingesetzte FXa die gemessene FVa Konzentration nicht signifikant beeinflusst. Es wird daher davon ausgegangen, dass bei den in der Messmethode verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten eine signifikante positive Rückkopplung von FXa auf thrombozytären FV verhindert wurde.

Des Weiteren hat sich als auffällig gezeigt, dass eine durch FVa vermittelte Generierung von Thrombin im Testansatz erst nach Vorverdünnung des eingesetzten Lysats messbar wurde. Die Lysate zeigten erst nach einer 1:16 Verdünnung eine entsprechende dynamisch messbare Aktivität. Alle weiteren Verdünnungsschritte bildeten dann jedoch einen verdünnungsechten Verlauf der gemessenen Aktivitäten ab. Es wird vermutet, dass ein im Lysat – und damit in Thrombozyten - vorhandener Inhibitor die aktivitätssteigernde Funktion von FVa bzw. die Gesamtfunktion des Prothrombinase-Komplexes hemmt. Erst in größerer Verdünnung fällt die durch ihn ausgelöste Inhibition in den Hintergrund. Als möglicher Thrombozyten-assoziiertes Inhibitor kommt die TFPI α -Isoform in Betracht. Es wird vermutet, dass diese Isoform eine spezifische Inhibition auf thrombozytären FVa ausübt. Publikationen beschreiben hierbei eine Interaktion zwischen der C-Terminale Domäne des TFPI α und einer auf thrombozytärem FV/FVa vorhandenen Struktur im sauren Bereich der B-Domäne. Des Weiteren kann die K2-Untereinheit des TFPI α durch Interaktion mit dem aktiven Zentrum von FXa den Umsatz des Prothrombinase-Komplexes beeinflussen. Diese Mechanismen bewirken letztendlich eine Verringerung der Prothrombinase-Aktivität um das 42-fache (Mast, 2016; Wood et al., 2014). Da der im Lysat vorhandene TFPI α in äquimolarer Menge zu FV ausverdünnt wird, muss vorwiegend seine direkte Auswirkung auf FXa als Inhibitionsursache in Betracht gezogen werden.

Mehrere Arbeiten haben beschrieben, dass thrombozytärer FV schon vor dem Kontakt mit seinen typischen Aktivatoren, wie Thrombin oder FXa, eine signifikante Kofaktoraktivität besitzt. Ursächlich hierfür werden Peptidstücke vermutet, welche durch eine Spaltung des aufgenommenen plasmatischen FV durch Thrombozyten-eigene

Proteasen entstehen (Ayombil et. al., 2013; Gould et al., 2004.; Monkovic et. al., 1990 b). Als eine dieser Proteasen wurde das in Thrombozyten vorhandene Calpain beschrieben (Bradford et al., 1988). Durch Strukturanalysen von thrombozytärem FV wurden Peptidstücke mit der Größe zwischen 34.000 kD und 330.000 kD ermittelt. Einige der Peptide des in Thrombozyten vorkommenden FV gleichen strukturell der schweren und leichten Kette von plasmatischem FVa. Es wird daher vermutet, dass diese für die oben beschriebene Kofaktoraktivität verantwortlich sind (Ayombil et. al., 2013; Gould et al., 2004; Monkovic et. al., 1990 a). Der etablierte Test verwendet die enzymatische FVa-Aktivität im Prothrombinase-Komplex zur Ermittlung der FVa-Konzentration. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die von Monkovic beschriebenen, bereits als Kofaktor fungierenden Peptide in der Messung mitefassen werden. Es sollte daher eine strukturelle Unterscheidung der beschriebenen FVa-Peptide (bestehend aus den Untereinheiten mit 105 kDa und 74 kDa) und der thrombozytären FV-Peptide mit aktivitätssteigernder Funktion auf FXa in Betracht gezogen werden, um eine Konzentrationsbestimmung des rein strukturellen FVa-Moleküls mit der Messmethode zu bestätigen.

4.6 Enzymatische Gesamt-Faktor V-Bestimmung

Um enzymatisch alle vorhandenen FV/Va-Moleküle zu erfassen, wurde eine modifizierte Version des etablierten Einstufen-Peptidtest verwendet. Hierfür wurde jeglicher im Lysat vorhandener FV durch Vorinkubation mit RVV aktiviert. Im Gegensatz zu der durch Tracy et al (Tracy et al., 1982) durchgeführten FV-Bestimmung wurde zur Aktivierung von FV zu FVa kein Thrombin eingesetzt. In der verwendeten enzymatischen Methode würde sich der Einsatz von Thrombin ungünstig auf die Genauigkeit des Messverfahrens auswirken, da die vorhandene FV-Konzentration über eine FV-abhängige Zunahme der Thrombin-Aktivität bestimmt wird. Als schneller, kompetenter Aktivator des im Lysat vorhandenen FV erwies sich das von Yadav beschriebene RVV (Yadav et al., 2017). Vorversuche zeigten, dass RVV neben der gewünschten enzymatischen Aktivierung von FV keine weiteren Auswirkungen auf die im Test ablaufenden Vorgänge hat. Hierdurch wurde eine anschließend gezielte Konzentrationsbestimmung des gesamten im Lysat vorhandenen FV ermöglicht. Die im Messverfahren durchschnittlich ermittelte FV-Gesamtkonzentration betrug $9 \mu\text{g}$ pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten.

4.7 Klinische Relevanz der etablierten Testverfahren

Patienten mit verschiedenartigen, homozygoten Mutationen des FV-Gens entwickeln einen hereditären FV-Mangel. Als Folge des fehlenden FV im Gerinnungssystem resultiert eine deutlich erhöhte Blutungsneigung mit Epistaxis, Menorrhagie und gastrointestinalen Blutungen (Boujard et al., 2017; Lak et al., 1998). Zur Risikominimierung und als Komplikationsvorsorge vor elektiv geplanten Operationen werden diese Patienten durch die Gabe von frischem, gefrorenem Plasma (FFP) (Asselta und Peyvandi, 2009) oder einer Thrombozytentransfusion (Drzymalski, 2019) versorgt, um den fehlenden FV zu substituieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die in Folge einer Substitution mit FFP eingetretene Erhöhung der FV-Plasmakonzentration auf 1,3 µg/ml schon 96 Stunden nach Infusion auf einen nicht mehr messbaren Wert gesunken war (Bouchard et.al, 2015). Quantitative Analysen der Konzentration von thrombozytärem FV mittels Western-Blotting haben jedoch gezeigt, dass diese 24 Stunden nach Gabe von FFP auf ein Maximum von durchschnittlich 609 Molekülen pro Thrombozyt angestiegen war. Auch 96 Stunden nach einer FFP-Infusion konnte noch eine Konzentration von ca. 434 Molekülen pro Thrombozyt nachgewiesen werden. Sogar zehn Tage nach Gabe von FFP bewirkte der in Thrombozyten gespeicherte FV eine kompetente blutstillende Wirkung. (Bouchard et.al, 2015). Folglich könnte die Kenntnis über physiologische Konzentrationen von thrombozytärem FV sowie die Möglichkeit der quantifizierbaren Messung von FV in Thrombozyten bei der Behandlung des hereditären FV-Mangels eine Optimierung des Therapiekonzepts ermöglichen. Es könnte etwa die Indikation der Gabe von FFP nach Kenntnis der aktuellen, patientenspezifischen thrombozytären FV-Konzentration genauer bestimmt werden. Ebenfalls könnte der Erfolg einer durchgeführten Therapie und damit verbundener Anstieg von thrombozytärem FV spezifischer überwacht werden.

Weiterhin wurde eine Studie über die Wirkung von thrombozytärem FV an transgenen Mäusen mit verschiedenen plasmatischen und thrombozytären FV-Konzentrationen durchgeführt. Hierbei wurde der Zusammenhang zwischen der Entstehung von arteriellen Thromben nach Verletzung der A. carotis mit FeCl₃ und der FV-Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass Mäuse mit höheren thrombozytären FV-Spiegeln die schnellste Verschlusszeit aufwiesen. Bei Mäusen mit genetischem FV-Mangel konnte durch Infusion

von Thrombozyten mit hohem FV-Spiegel eine Reduktion der Okklusionszeit erreicht werden. Infusion von plasmatischem FV zeigte diese Reduktion jedoch nicht. (Ren et. al., 2017). Diese Ergebnisse der Studie zeigen die Signifikanz von thrombozytärem FV in der Blutgerinnung bzw. Entstehung von arteriellen Thromben und das damit verbundene Potential als weiterer Laborparameter zur Bestimmung der Effizienz des Gerinnungssystems eines Patienten. Des Weiteren konnten Ren et. al. (2017) belegen, dass thrombozytärer FV wahrscheinlich als Verstärker der Aktivierung von Thrombozyten fungiert. Hierfür wurde das Blut von Mäusen mit und ohne thrombozytärem FV-Mangel verglichen. Bei Aktivierung der Thrombozyten durch ADP, konnte eine höhere Dichte von P-Selektin (CD62P) in Anwesenheit von thrombozytärem FV gemessen werden. Zur Messung wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren verwendet. Auch die Bestimmung der intrazellulären cGMP-Konzentration zeigte eine positive Korrelation mit der thrombozytären FV-Konzentration. Sowohl P-Selektin als auch intrazelluläres cGMP stehen im Zusammenhang mit der Thrombin-vermittelten Thrombozytenaktivierung und daraus resultierenden thrombotischen Ereignissen. Es liegt daher der Verdacht nahe, dass thrombozytärer FV ein kritischer Mediator der arteriellen Thrombose sein könnte (Ren et. al., 2017). Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden zum Monitoring von thrombozytärem FV könnten daher als prognostisches Instrument zur Einschätzung der arteriellen Thrombosegefahr bei Risikopatienten verwendet werden.

Yang et al. (2017) beobachtete in einer Studie die Auswirkungen von thrombozytärem FV auf die Angiogenese in transgenen Mäusen. Hierfür wurde die Durchblutung der Beingefäße nach Ligatur der A. femoralis für zwei Wochen gemessen. In der Studie wurden verschiedene Mauspopulationen mit genetisch bedingter, unterschiedlicher FV-Konzentration verwendet. Die ermittelten Werte haben gezeigt, dass das Ausmaß der Angiogenese mit der thrombozytären FV-Konzentration korreliert. Kontrollversuche mit zusätzlich eingesetztem Thrombin-Inhibitor (Hirudin) zeigten jedoch, dass die steigernde Wirkung Thrombin-abhängig geschieht. Dennoch konnte mittels quantitativer real-time PCR-Analyse des ischämischen Gewebes bestätigt werden, dass eine thrombozytär FV-abhängige Erhöhung der Genexpression von gefäßproliferativen Mediatoren wie VEGF-A, FGF-2, und MCP-1 entsteht. Immunhistochemische Färbungen mittels anti-CD41 zwei Wochen nach induzierter Ischämie zeigten einen FV-abhängigen Anstieg der extrakapillären, CD41-positiven Thrombozyten im ischämischen Muskel. Dies lässt

vermuten, dass Thrombozyten mit höherer FV-Konzentration in verletztem Gewebe bevorzugt aktiviert werden und daraus resultierend aggregieren. Yang zeigte auf, dass die somit gewonnenen Erkenntnisse als neues Ziel für therapeutische Ansätze genutzt werden könnten. Eine gezielte Modulation der thrombozytären FV-Konzentration könnte somit als neue Möglichkeit zur Steuerung der Angiogenese eingesetzt werden, ohne das Blutungsrisiko zu sehr zu beeinflussen (Yang et al., 2017). Um den hier ermöglichten Ansatz der therapeutischen Intervention umzusetzen, ist eine genaue Kenntnis der individuellen thrombozytären FV-Konzentration nötig. Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Bestimmung der genauen thrombozytären FV-Konzentration könnten auch hierfür eine wichtige Grundlage legen.

Kommt es durch Mutationen des FV-Gens zum eingangs beschriebenen Krankheitsbild FV-Leiden, besteht für die Patienten ein durchgehend erhöhtes Risiko auf ein thromboembolisches Ereignis. Dieses beruht auf einer Resistenz von FVa^{Leiden} gegen die Inaktivierung durch aPC (Albagoush und Schmidt, 2019). Untersuchungen zur Inaktivierung von thrombozytärem FVa durch aPC haben gezeigt, dass in Anwesenheit von durch Thrombin aktiviertem plasmatischen FVa ebenfalls ein Schutz gegen die komplette Inaktivierung durch aPC besteht (Camire et al., 1998). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch nicht beschrieben, wie sich das Krankheitsbild auf die Konzentrationen von thrombozytärem FV(a) auswirkt. Wie beschrieben, stellt Ren et. al. (2017) thrombozytären FV unter Verdacht, als wichtiger Mediator von thromboembolischen Ereignissen zu agieren. Daher könnte die quantitative Bestimmung von thrombozytärem FV/FVa bei Patienten mit FV-Leiden-Mutation klären, ob eine Veränderung der Konzentration dieser Koenzyme vorliegt und ob diese an der Pathophysiologie des Krankheitsbildes beteiligt sind. Dies könnte neue Ansätze für Prognostik und Therapie der Erkrankung ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Faktor FV (FV) nimmt eine wichtige Rolle zur Steuerung der Blutgerinnung ein. Hierbei kann er sowohl prokoagulatorisch als auch antikoagulatorisch wirksam werden. Im menschlichen Körper sind zwei Populationen von FV bekannt. Der plasmatische FV und ein in Thrombozyten aufgenommener thrombozytärer FV. Letzterer weist sowohl strukturelle als auch funktionelle Besonderheiten auf. Nach aktuellem Stand der Forschung gibt es keine Methode zur Bestimmung der Konzentration von thrombozytärem FV, welche diese Besonderheiten berücksichtigt.

In dieser Arbeit wurde ein solches Testverfahren entwickelt. Die zu untersuchenden Thrombozytenlysate wurden aus Vollblutproben gewonnen. Hierzu wurden Thrombozyten mittels differentieller Zentrifugation und einem anschließenden Waschvorgang isoliert und anschließend lysiert. Das so gewonnene Lysat konnte für alle anschließenden Messverfahren verwendet werden. Es wurden drei Messmethoden zur FV-Konzentrationsbestimmung etabliert. Erstens wurde eine koagulometrische Bestimmung von FV mittels eines FV-Einstufen-Tests gewählt. Diese wurde mittels eines automatisierten Gerinnungsanalysers durchgeführt. Des Weiteren wurde ein enzymatischer Einstufen-Peptid-Substrattest zur Bestimmung von thrombozytärem, aktiviertem FV (FVa) entwickelt. Durch vorherige Aktivierung von, im Lysat vorhandenem FV mittels Russell's viper venom (RVV) konnte auch eine Bestimmung der thrombozytären Gesamt-FV-Konzentration im enzymatischen Einstufen-Peptid-Substrattest ermöglicht werden. Die koagulometrisch bestimmte durchschnittliche Konzentration von thrombozytärem FV betrug $0,87 \mu\text{g}$ pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten. Die enzymatisch ermittelte FVa-Konzentration lag bei $1,17 \mu\text{g}$ pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten. Nach Aktivierung mit RVV wurde im enzymatischen Messverfahren eine thrombozytäre FV-Gesamtkonzentration von $9 \mu\text{g}$ pro $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten ermittelt.

Die in dieser Arbeit entwickelten Testverfahren zur Konzentrationsbestimmung von thrombozytärem FV legen die Grundlage für mehrere Arbeitsansätze. So könnte eine standardmäßige Konzentrationsbestimmung die Risikoeinschätzung bei Prophylaxe von thrombotischen Ereignissen verbessern. Auch im Bereich der Steuerung von Angiogenese könnte die nun vorhandene Möglichkeit der routinemäßigen Messung von thrombozytären FV-Konzentrationen die Grundlage für neue Behandlungskonzepte legen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der sekundären Hämostase	11
Abbildung 2: Faktor V Aktivierung	16
Abbildung 3: Schema des Einstufen-Peptidtests	26
Abbildung 4: Verwendetes Pipettierschema	27
Abbildung 5: Auswirkung von Thrombin oder FXa auf I-1560	31
Abbildung 6: Ermittlung der FXa-Konzentration	32
Abbildung 7: Ermittlung der Prothrombinkonzentration	33
Abbildung 8: Ermittlung der FVa-Standardkurve	34
Abbildung 9: Ermittlung der Lysatverdünnung	35
Abbildung 10: Lysataktivität nach Lagerung bei -80°C	36
Abbildung 11: Inhibition der Thrombinabhängigen FV-Aktivierung	37
Abbildung 12: Ermittlung der RVV-Konzentration	38
Abbildung 13: Auswirkungen der Aptamere NB 1-83 und HS02-52G auf aPC-Aktivität	40
Abbildung 14: Auswirkungen von aPC auf FV	41
Abbildung 15: Aktivierung von in Lysat vorhandenem thrombozytärem FV durch FXa	42
Abbildung 16: Einfluss versch. FXa-Konzentrationen auf Testansatz	44
Abbildung 17: Anreicherung der Thrombozyten durch Waschvorgang	46
Abbildung 18: Koagulometrisch ermittelte FV-Konzentration	47
Abbildung 19: Enzymatisch bestimmte FVa-Konzentration	48
Abbildung 20: Enzymatisch bestimmte FV-Gesamtkonzentration	49
Abbildung 21: Vergleich der koagulometrisch und enzymatisch ermittelten FV-Konzentrationen	50

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Koagulometrische Messung von FV und FIX	30
Tabelle 2: Reproduzierbarkeit und Variabilität	45

8. Literaturverzeichnis

Albagoush SA, Chakraborty RK, Schmidt AE. Factor V Leiden Deficiency. StatPearls Publishing 2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534802/>

Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood* 2000; 95: 1694–1702

Ament L. Factor V Leiden: a review of the literature. *J. Perinat. Neonatal. Nurs.* 2003; 17: 190-195

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

Ayombil F, Abdalla S, Tracy PB, Bouchard BA. Proteolysis of plasma-derived factor V following its endocytosis by megakaryocytes forms the platelet-derived factor V/Va pool. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11: 1532–1539

Barthels M., Bergmann F, Czwalinna A. Einzelfaktoren und Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung. In: Barthels M, Hrsg. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013: 421-685

Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 1995; 74: 449-453

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

Bouchard BA, Taatjes DJ, Meisler NT, Tracy PB. Subsequent to Its Endocytosis by Megakaryocytes, Factor V Is Trafficked to the [Italic]cis[/Italic]-Golgi Network Prior to Its Storage in α -Granules. *Blood* 2006; 108:1697

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

Bouchard BA, Chapin J, Brummel-Ziedins KE, Durda P, Key NS, Tracy PB. Platelets and platelet-derived factor Va confer hemostatic competence in complete factor V deficiency. *Blood* 2015; 4 125: 3647–3650

Boujrad S, El Hasbaoui, Echahdi H, Malih M, Agadr A. Factor V congenital deficiency: about a case. *Pan. Afr. Med.* 2017; 27: 182

Bradford HN, Annamalai A, Doshi K, Colman RW. Factor V is activated and cleaved by platelet calpain: comparison with thrombin proteolysis. *Blood* 1988; 71: 388–394

Bradford HN, Krishnaswamy S. Occlusion of anion binding exosite 2 in meizothrombin explains its impaired ability to activate factor V. *J. Biol. Chem.* 2019; 294: 2422-2435

Camire RM, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A, Tracy PB. Platelet-Derived Factor Va/Va Leiden Cofactor Activities Are Sustained on the Surface of Activated Platelets Despite the Presence of Activated Protein C. *Blood* 1998; 91: 2818-2829

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

Colman RW. Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968; 35: 273–279.

Corral-Rodríguez MÁ, Bock PE, Hernández-Carvajal E, Gutiérrez-Gallego R, Fuentes-Prior P. Structural basis of thrombin-mediated factor V activation: the Glu⁶⁶⁶-Glu⁶⁷² sequence is critical for processing at the heavy chain–B domain junction. *Blood* 2011; 117: 7164–7173

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

Dahlbäck B, Guo LJ, Livaja-Koshlar R, Tran S. Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPI α) cofactors. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2017; 2: 114–124

van Doorn P, Rosing J, Wielders SJ, Hackeng TM, Castoldi E. The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor- α inhibits factor V activation by protecting the Arg¹⁵⁴⁵ cleavage site. *J. Thromb. Haemost.* 2017; 15: 140-149

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

Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabrilili P, Gavasso S, Rosing J, Castoldi E. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood* 2010; 115: 879-86.

Esmon CT, Schwarz HP. An update on clinical and basic aspects of the protein C anticoagulant pathway. *Trends. Cardiovasc. Med.* 1995; 5:141-148.

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

Fitzgibbon S, Spann AP, Qi QM, Shaqfeh ESG. In Vitro Measurement of Particle Margination in the Microchannel Flow: Effect of Varying Hematocrit. *Biophys. J.* 2015; 108: 2601–2608

Franchini M, Liunbruno GM, Bonfanti C, Lippi G. The evolution of anticoagulant therapy. *Blood Transfus.* 2016; 14: 175–184

Ganser A, Physiologie der Thrombozyten. In: Barthels M, Hrsg. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013: 32-38

Gerz JM, McLean KC, Bouchard BA. Endocytosed factor V is trafficked to CD42b+ proplatelet extensions during differentiation of human umbilical cord blood-derived megakaryocytes. *J. Cell Physiol.* 2018; 233: 8691-8700

Goldsmith GH Jr, Saito H, Ratnoff OS. The activation of plasminogen by Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments. *J. Clin. Invest.* 1978; 62: 54–60

Gould WR, Silveira JR, Tracy PB. Unique in Vivo Modifications of Coagulation Factor V Produce a Physically and Functionally Distinct Platelet-derived Cofactor. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 2383-2393

Hamedani NS, Rühl H, Zimmermann JJ, Heiseler T, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B, Müller J. In Vitro Evaluation of Aptamer-Based Reversible Inhibition of Anticoagulant Activated Protein C as a Novel Supportive Hemostatic Approach. *Nucleic Acid Ther.* 2016; 26:355-362

Hemker HC. A century of heparin: past, present and future. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14: 2329-2338

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

Jackson C. Antithrombin. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. Hämostasiologie, 2.Aufl. Heidelberg: Springer; 2010: 260-266

Jeimy SB, Fuller N, Tasneem S, Segers K, Stafford AR, Weitz JI, Camire RM, Nicolaes GA, Hayward CP. Multimerin 1 binds factor V and activated factor V with high affinity and inhibits thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 2008; 100: 1058-67

Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 31869-31880

Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW. Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats. *Biochemistry* 1987; 26: 6508-6514

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

Keller FG, Ortel TL, Quinn-Allen MA, Kane WH. Thrombin-catalyzed activation of recombinant human factor V. *Biochemistry* 1995; 34: 4118-4124

Knesek D, Peterson TC, Markel DC. Thromboembolic Prophylaxis in Total Joint Arthroplasty. *Thrombosis.* 2012; 2012: 837896

Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 1987; 7: 3291-3299

Lak M, Sharifian R, Peyvandi F, Mannucci PM. Symptoms of inherited factor V deficiency in 35 Iranian patients. *Br. J. Haematol.* 1998; 103: 1067-1069

Levy JH, Sniecinski RM, Welsby IJ, Levi M. Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb. Haemost.* 2016; 115: 712-728

Lord ST. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr. Opin. Hematol.* 2007;14: 236–241

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 2341–2349

Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 1345-1352

Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 1964; 202: 498–499

McVey JH. The role of the tissue factor pathway in haemostasis and beyond. *Curr. Opin. Hematol.* 2016; 23:453–461

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

Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* 1990; 29(5): 1118–1128.

Monkovic DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17132-17140

Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 1996; 88: 2081-2092

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

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

Ogawa T, Verhamme IM, Sun MF, Bock PE, Gailani D. Exosite-mediated Substrate Recognition of Factor IX by Factor Xia. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 23523-23530

Owren PA. The fifth coagulation factor ('Factor V'). Preparation and properties. *Biochem. J.* 1948; 43:136–139.

Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 2014; 58: 515–523

Peraramelli S, Thomassen S, Heinzmann A, Hackeng TM, Hartmann R, Scheifflinger F, Dockal M, Rosing J. Role of exosite binding modulators in the inhibition of Fxa by TFPI. *Thromb. Haemost.* 2016; 115: 580-590

Preissner K.T. Regulation der plasmatischen Gerinnungskaskade. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostasiologie*, 2.Aufl. Heidelberg: Springer; 2010: 123-126

Preissner K.T. Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren. In: Pötzsch B, Madlener K, Hrsg. *Hämostasiologie*, 2.Aufl. Heidelberg: Springer; 2010: 159-166

Rand MD, Kalafatis M, Mann KG. Platelet coagulation factor Va: the major secretory platelet phosphoprotein *Blood* 1994; 83: 2180-2190

Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 1980; 208: 1036–1037

Ren M, Li R, Chen N, Pang N, Li Y, Deng X, Wang L, Luo M, Liu Y, Hao H, Liu Y, Sun H, Wu J. Platelet-Derived Factor V Is a Critical Mediator of Arterial Thrombosis. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; 6: e006345

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

Samis JA, Garrett M, Manuel RP, Nesheim ME, Giles AR. Human neutrophil elastase activates human factor V but inactivates thrombin-activated human factor V. *Blood* 1997; 90: 1065-1074.

Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657–666

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

Stief T. Protein C. In: Gressner A.M., Arndt T. Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019: 1978-1979

Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck 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

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

Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood* 1982; 60: 59-63

Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2013; 110: 17838–1784

Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 2014; 123: 2934 – 2943

Yadav PK, Antonyraj CB, Basheer Ahamed SI, Srinivas S. Understanding Russell's viper venom factor V activator's substrate specificity by surface plasmon resonance and in-silico studies. *PLoS One*. 2017; 12: e0181216

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

9. Danksagung

Ich möchte allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich während der Durchführung dieser Arbeit und während meines Studiums unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. med. Bernd Pötzsch für die Bereitstellung des Promotionsthemas und aller dafür benötigten Mittel. Ich habe jederzeit die umfassende wissenschaftliche Betreuung geschätzt.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. biol. hom. Jens Müller, der mir mit unzähligen Tipps und Tricks und sehr viel Geduld zur Seite gestanden hat.

Auch den Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Uni Bonn möchte ich für die vielen angenehmen Stunden im Labor und der Mensa danken. Frau Simone Gasper und Frau Iris Neuerburg gilt hierbei mein besonderer Dank.

Ich danke Herrn Alexander Bertrams, dass er mir für die Erstellung der Grafiken in dieser Arbeit die nötigen Tipps und Hilfestellungen gegeben hat.

Auch meiner Familie möchte ich danken. Es hat mir sehr viel Mut und Selbstvertrauen gegeben, dass sie meinen späten Wunsch Medizin zu studieren immer und in vollem Umfang unterstützt haben.

Ich danke meinen Mitbewohnern Frau Rebekka Borges und Herrn Jost Völker, dass sie mich in all meinen Hochs und Tiefs während der Durchführung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Danke, dass ihr Bonn zu meinem Zuhause gemacht habt.