

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Proteolytische Aktivität von APC bei der Inaktivierung
verschiedener Faktor VIII-Präparate und
bei der Faktor VIIIa-Inaktivierung
in Gegenwart eines APC-DNA-Aptamers**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christina Dücker
Tierärztin
aus Bonn

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3481

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Pöttsch
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
factor VIII, nucleotide sequences, haemostasis

Tag der Promotion: 27.01.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-174-1
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

meiner Oma Gretchen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung und Fragestellung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | 3 |
| 2.1. Hämostase | 3 |
| 2.1.1. Primäre Hämostase | 3 |
| 2.1.2. Sekundäre Hämostase | 4 |
| 2.1.2.1. Extrinsisches System | 5 |
| 2.1.2.2. Intrinsisches System | 6 |
| 2.1.3. Inhibitoren der Gerinnung | 6 |
| 2.2. Das Protein-C-System | 7 |
| 2.2.1. Thrombomodulin | 7 |
| 2.2.2. Protein C | 8 |
| 2.2.3. Aktiviertes Protein C | 9 |
| 2.2.4. Protein S | 10 |
| 2.2.5. Antikoagulatorische Aktivität von APC | 10 |
| 2.2.6. Regulation der APC-Aktivität im Plasma | 11 |
| 2.3. Faktor VIII | 11 |
| 2.3.1. Faktor VIII-Gen | 11 |
| 2.3.2. Faktor VIII-Protein | 11 |
| 2.3.3. Faktor VIII-vWF | 13 |
| 2.3.4. Faktor VIII-Aktivierung | 14 |
| 2.3.5. Faktor VIIIa | 15 |
| 2.3.6. Faktor VIIIa-Inaktivierung | 16 |
| 2.4. Hämophilie A | 17 |
| 2.5. Aptamere | 19 |
| 2.5.1. Aptamere und ihre funktionellen Eigenschaften | 19 |
| 2.5.2. Vorteile von Aptameren im Hinblick auf ihre Anwendung | 20 |
| 2.5.3. Einsatzgebiete von Aptameren | 22 |
| 2.5.3.1. Target-Validierung | 22 |
| 2.5.3.2. Diagnostik | 22 |
| 2.5.3.3. Therapie | 23 |
| 2.5.4. SELEX | 24 |
| 2.5.4.1. SELEX-Prozess zur Gewinnung von DNA-Aptameren | 25 |
| 2.5.4.2. SELEX-Prozess zur Gewinnung von RNA-Aptameren | 26 |
| 2.6. Selektion von DNA-Aptameren gegen APC | 27 |
| 2.6.1. SELEX-Prozess | 27 |
| 2.6.2. Bindungseigenschaften und Klonierung des selektierten D1-Pools | 27 |
| 2.6.3. Herstellung der Aptamere HSO ₂ , HSO ₃ , HSO ₄ und HSO ₈ | 29 |
| 2.6.4. Bindungseigenschaften der monoklonalen Aptamersequenzen | 29 |
| 2.6.5. Spezifität der monoklonalen Aptamersequenzen | 30 |
| 2.6.6. Sekundärstruktur-Analyse, Herstellung und Aufreinigung der HSO ₂ -Varianten | 31 |
| 3. Material und Methoden | 33 |
| 3.1. Blutgerinnungsfaktor VIII-Präparate | 33 |
| 3.2. Puffer | 33 |
| 3.3.1. Koagulometrische Gerinnungsteste | 35 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.1.1. Messung mit immunadsorbiertem Faktor VIII-Mangelplasma | 35 |
| 3.3.1.2. Messung mit natürlichem Faktor VIII-Mangelplasma | 36 |
| 3.3.2. Amidolytische Aktivitätstestung | 36 |
| 3.4. Wirkung von APC auf aktivierte Faktor VIII-Präparate | 37 |
| 3.5. Untersuchung des Einflusses eines APC-Aptamers auf aktiviertes Protein C | 39 |
| 3.5.1. Aktivierung des verwendeten Faktor VIII-Konzentrates Recombinate | 39 |
| 3.5.1.1. Untersuchung des Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Faktor VIII-Aktivierung | 40 |
| 3.5.1.2. Kinetische Untersuchung der Faktor VIII-Aktivierung | 40 |
| 3.5.2. Inaktivierung des aktivierten Faktor VIII-Konzentrates durch APC | 40 |
| 3.5.3. Bestimmung der Inaktivierung von Faktor VIII durch Aptamer-gebundenes APC | 42 |
| 3.5.3.1. Einfluß der Konzentration der HS02-Aptamer-Varianten auf die Faktor VIII Aktivität | 43 |
| 3.5.3.2. Kinetische Untersuchung der Faktor VIII-Aktivität bei Aptamer-gebundenem APC | 44 |
| 3.6. Statistische Auswertung | 45 |
| 4. Ergebnisse | 47 |
| 4.1. Bestimmung der Aktivität in Faktor VIII-Präparaten | 47 |
| 4.2. Aktivierung von Faktor VIII-Präparaten in Abhängigkeit von der Thrombin-Konzentration | 48 |
| 4.2.1. Überprüfung des Einflusses von Hirudin auf die Aktivität von Faktor VIII | 48 |
| 4.2.2. Überprüfung des Einflusses von Hirudin auf die Aktivität von Thrombin | 49 |
| 4.2.3. Bestimmung der Faktor VIII-Aktivierung mittels koagulometrischer Messung | 50 |
| 4.2.4. Bestimmung der FVIII-Aktivierung mittels eines fluorogenen Assays | 52 |
| 4.3. Überprüfung des Einflusses von verschiedenen Faktor VIII-Konzentrationen auf deren Thrombin-vermittelte Aktivierung | 53 |
| 4.4. Etablierung eines Assays zum Nachweis eines Thrombin-Inhibitors (Thrombin-Neutralisationstest) | 54 |
| 4.5. Thrombin-Neutralisationstest | 55 |
| 4.6. Wirkung von APC auf aktivierte Faktor VIII-Präparate | 56 |
| 4.7. Einfluß des APC-Aptameres HS02 und dessen verkürzteVarianten auf die APC-vermittelte Inaktivierung von Faktor VIIIa | 58 |
| 4.7.1. Thrombin-vermittelte Aktivierung des Faktor VIII-Konzentrates Recombinate | 58 |
| 4.7.2. APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIIa (Recombinat) | 60 |
| 4.7.3. Intra-Assay-Varianz | 60 |
| 4.7.4. Einfluß der HS02-Aptamer-Varianten auf die APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIIa | 61 |
| 4.7.5. Überprüfung des Einflusses der HSO2-Varianten auf die Aktivität des Tenase-Komplexes | 63 |
| 4.7.6. Vergleichende kinetische Untersuchung des Einflusses von HS02-88 und HS02-44G auf die Faktor VIIIa-Inaktivierung | 64 |
| 5. Diskussion | 65 |
| 5.1. Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität der Faktor VIII-Präparate | 65 |
| 5.2. Vergleichende Aktivierung der Faktor VIII-Präparate durch Thrombin | 70 |
| 5.3. Vergleichende Inaktivierung der Faktor VIII-Präparate durch APC | 74 |
| 5.4. Beeinflussung der proteolytischen Aktivität von APC bei der Inaktivierung von Faktor VIIIa durch das APC-DNA-Aptamer HS02 | 75 |
| 6. Ausblick | 81 |
| 7. Zusammenfassung | 83 |
| 8. Summary | 85 |
| 9. Literaturverzeichnis | 87 |
| 10. Anhang | 105 |
| 10.1. Laborgeräte | 105 |

| | |
|---|------------|
| 10.2. Chemikalien, Biochemikalien und Verbrauchsmaterialien | 105 |
| 11. Publikationen | 106 |
| 12. Danksagung | 107 |
| 13. Selbständigkeitserklärung | 108 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| a | aktiviert (Blutgerinnungsfaktoren) |
| a1, a2, a3 | saure Regionen des Faktor VIII-Moleküls |
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| APC | aktiviertes Protein C |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| Arg | Arginin |
| AS | Aminosäure |
| Asn | Asparagin |
| Asp | Aspartat |
| AT | Antithrombin |
| BDD-FVIII | B-Domänen-deletierter Faktor VIII |
| BDD-rFVIII | B-Domänen-deletierter rekombinanter Faktor VIII |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| Cys | Cystein |
| D1-Pool | Startbibliothek aus einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (=desoxyribonucleic acid) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| ds | doppelsträngig (=double-stranded) |
| EGF | Epidermal Growth Faktor |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| EPCR | endothelialer Protein-C-Rezeptor |
| et al. | et alii (=und andere) |
| F | Faktor (Blutgerinnungsfaktor) |
| FII | Faktor II (=Prothrombin) |
| FIIa | Faktor IIa (=Thrombin) |
| FU | Fluoreszierende Einheit (=Fluorescent unit) |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| Gla | Glutaminsäure-Domäne |
| His | Histidin |
| HMW | high-molecular-weight multimers |
| IC ₅₀ | halbmaximale inhibitorischen Konzentration IC ₅₀ inhibitory concentration 50 % |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| IU | Internationale Einheiten (=International Units) |
| kDa | Kilo Dalton |
| Kd | Dissoziationskonstante |
| l | Liter |
| Lys | Lysin |
| M | molar (mol/l) |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar (mmol/l) |
| MW | arithmetischer Mittelwert |
| n | Anzahl |
| ng | Nanogramm |
| n.g. | nicht geronnen |
| nm | Nanometer (Wellenlänge) |
| nM | nanomolar (nmol/l) |
| nmol | Nanomol |
| ³² p-ATP | mit radioaktivem Phosphor ³² p markiertes Adenosintriphosphat |
| pbFVIII | plasmabasierter FaktorVIII |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (=phosphate buffered saline) |
| PC | Protein C |
| PCI | Protein C-Inhibitor |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (=Polymerase Chain Reaction) |
| pH | negative dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PL | Phospholipid (e) |
| pM | pikomolar (pmol/l) |
| pmol | Pikomol |
| PS | Protein S |
| p-Wert | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| rFVIII | rekombinanter Faktor VIII |
| RNA | Ribonukleinsäure (= ribonucleic acid) |
| RNase | Ribonuklease |
| s | Standardabweichung |
| SELEX | Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification |
| Ser | Serin |
| Serpine | Serin-Protease-Inhibitoren |
| ss | Einzelsträngig (=single-stranded) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| SSC | Scientific and Standardization Comitee der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TF | Tissue Faktor |
| TFPI | Tissue faktor pathway inhibitor |
| TM | Thrombomodulin |
| TRIS | Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan |
| UKHCDO | United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (=Vascular Endothel Growth Faktor) |
| vWF | Von-Willebrand-Faktor |
| w/v | Gewicht pro Volumen (=weight per volume) |
| z.B. | zum Beispiel |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | mikromolar (µmol/l) |
| % | Prozent |
| < | kleiner als |
| > | größer als |
| # | Anzahl der Selektionsrunden im SELEX-Prozeß |
| * | Multiplizieren |
| (/) | Dividieren |

1. Einleitung und Fragestellung

Aktiviertes Protein C (APC) ist eine Serinprotease, die eine zentrale Rolle in der Regulation der Gerinnungsaktivierung des Blutes spielt. Sie wirkt gerinnungshemmend, indem sie die zur Thrombinbildung benötigten Kofaktoren Faktor V (FV) und Faktor VIII (FVIII) durch proteolytische Spaltung inaktiviert (Dahlbäck und Villoutreix, 2005b). Die im Plasma vorliegende APC-Aktivität hat dementsprechend einen unmittelbaren Einfluss auf die FVIII-Aktivität. Im Fall von therapeutisch eingesetzten FVIII-Konzentraten, zum Beispiel in der Substitutionstherapie zur Behandlung der Hämophilie A beim Menschen, kann eine erhöhte Sensitivität (Empfindlichkeit) für APC zu einer verminderten therapeutischen Wirksamkeit der FVIII-Konzentrate führen. Untersuchungen zur APC-Sensitivität von verschiedenen FVIII-Präparaten existieren bisher nur wenig und wurden mit lediglich drei unterschiedlichen FVIII-Präparaten durchgeführt (Khrenov et al., 2006).

Zur FVIII-Substitutionstherapie stehen in Deutschland 13 zugelassene humane FVIII-Präparate zur Verfügung (Rote Liste, 2006). Bei FVIII-Präparaten wird unterschieden zwischen plasmabasiertem (pb) FVIII und rekombinant (r) hergestelltem FVIII. Weitere Unterschiede bestehen aufgrund enthaltener bzw. angewendeter Zusatzstoffe (unter anderem menschliche oder tierische Proteine) sowie durchgeführte Virusabreicherungs- und Inaktivierungsverfahren (Kessler, 2005).

Die Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgt durch Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) im Einstufen-Gerinnungstest und durch Messung mit chromogenem Testverfahren. Der in früheren Zeiten angewendete Zweistufen-Gerinnungstest wird heute fast nicht mehr zur FVIII-Messung eingesetzt. Unterschiede zwischen den Messmethoden und innerhalb einer Messmethode bei der Durchführung durch verschiedene Labore treten trotz Weiterentwicklung und Standardisierung der Methoden zur FVIII-Messung auf (Barrowcliffe et al., 2002). Diskutiert werden eine Vielzahl an Ursachen für Messunterschiede zwischen Einstufen-Gerinnungstest und chromogenem Test. In diesem Zusammenhang werden auch Unterschiede im Aktivierungsprofil der einzelnen FVIII-Präparate bei der Aktivierung durch Thrombin in Betracht gezogen (Hubbard et al., 2002a). Auch Unterschiede in der APC-Empfindlichkeit von FVIII-Präparaten werden als eine der möglichen Ursachen für Messdiskrepanzen zwischen Einstufen-Gerinnungstest und chromogenem Test diskutiert (Khrenov et al., 2006).

Die Hemmung der antikoagulatorischen Aktivität von APC könnte einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung der Hämophilie A darstellen. Obschon die existierenden FVIII-Produkte eine sichere und wirksame Behandlung der Erkrankung gewährleisten, existieren verschiedenartige Bemühungen zur Weiterentwicklung der vorhandenen FVIII-Konzentrate. Die hohen Kosten der Substitutionstherapie und die Entwicklung von Hemmkörpern im Verlauf der Behandlung sind die wesentlichen Gründe für die Versuche zur Fortentwicklung von FVIII-Präparaten (Mannucci, 2002; 2003). Einen der Ansatzpunkte der Forschung bilden Maßnahmen zur Verlängerung der FVIIIa-Halbwertszeit. Neben Entwicklungen zur Verhinderung des spontanen Zerfalls des instabilen FVIIIa-

Moleküls ist ein weiterer Aspekt der Forschung der Eingriff in die proteolytische FVIIIa-Inaktivierung durch APC (Graw et al., 2005). Hierzu zählt auch der Einsatz von APC-Inhibitoren. Experimente zeigten, dass entwickelte synthetische APC-Inhibitoren von Bedeutung sein könnten, um den FVIII-Gehalt bei der Hämophilie A-Erkrankung zu steigern (De Nanteuil et al., 2006). Absicht eines solchen Eingriffs in die APC-Aktivität ist das Erreichen einer verringerten FVIII-Menge, die zur Normalisierung der Hämostase appliziert werden muss bzw. eine Verlängerung des Applikationsintervalls.

Einen möglichen Weg zur Entwicklung eines spezifischen APC-Inhibitors bildet die Selektion von APC-spezifischen DNA-Aptameren (HS02), die von der Arbeitsgruppe Pötzsch/Müller/Mayer der Universitätsklinik und Universität Bonn entwickelt und hergestellt wurden und für diese Arbeit verwendet werden konnten. Aptamer-Ausgangssequenzen (Volllängenaptamere) bestehen aus einer Länge von 70-80 Nukleotiden. Minimalmotive (minimale Bindungsmotive) von Aptameren stellen verkürzte Varianten der Aptamer-Ausgangssequenz dar, bei denen die nicht für die Bindung an das Target (Zielmolekül) erforderlichen Nukleotid-Sequenzen entfernt worden sind (Jayasena, 1999).

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Ziele. Zum einen sollte die proteolytische Aktivität von APC bei der FVIIIa-Inaktivierung verschiedener FVIII-Präparate und die APC-Sensitivitäten dieser FVIII-Präparate gegenüber der Inaktivierung durch APC vergleichend überprüft werden. Für die Untersuchung standen zehn verschiedene humane FVIII-Präparate, fünf pb- und fünf rFVIII-Präparate zur Verfügung. Zu Beginn der Versuchsreihe sollten diese zehn FVIII-Präparate funktionell analysiert und hierzu die vergleichende Bestimmung der FVIII-Aktivität mit verschiedenen Messmethoden und die vergleichende Thrombin-vermittelte Aktivierung untersucht werden.

Als zweiter Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss des in der Arbeitsgruppe hergestellten APC-DNA-Aptamers HS02 auf die proteolytische APC-Aktivität bei der FVIIIa-Inaktivierung überprüft werden. Falls der HS02-Ausgangssequenz hierbei ein Effekt zugeordnet werden kann, sollte das Minimalmotiv der HS02-Aptamer-Varianten ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Unterscheiden sich die in dieser Arbeit eingesetzten fünf humanen pb- und fünf rFVIII-Präparate bei der Aktivitätsbestimmung durch zwei verschiedene Einstufen-Gerinnungstests und chromogenen Test?
2. Unterscheiden sich die in dieser Arbeit eingesetzten fünf pb- und fünf rFVIII-Präparate in der Thrombin-vermittelten Aktivierung?
3. Können Unterschiede in der proteolytischen APC-Aktivität bei der Inaktivierung der aktivierten fünf pb- und fünf rFVIII-Präparate und in der APC-Sensitivität dieser FVIII-Präparate ermittelt werden?
4. Welchen Einfluss hat das von der Arbeitsgruppe hergestellte APC-Aptamer HS02 auf die proteolytische Aktivität von APC in Hinblick auf die APC-induzierte FVIIIa-Inaktivierung?
5. Kann ein Minimalmotiv der von der Arbeitsgruppe hergestellten APC-Aptamere HS02 auf der HS02-Original-Sequenz basierenden Aptamer-Varianten ermittelt werden?

2. Literaturübersicht

2.1. Hämostase

Gemäß Definition ist die Hämostase die Beendigung einer Blutung. Praktisch wird der Begriff Hämostase allerdings synonym mit dem Begriff Gerinnung verwendet und umfasst den gesamten physiologischen Prozess, durch den die Fluidität und Zirkulation des Blutes beendet wird (Aird, 2005).

Das Blutgerinnungssystem besteht aus pro- und antikoagulatorischen Faktoren, die unter normalen Bedingungen im Gleichgewicht zueinander stehen (Aird, 2005). Auf der einen Seite findet eine ständige Gerinnungshemmung statt, um unkontrollierte und generalisierte Gerinnungen im Blutkreislauf zu verhindern. Andererseits erfordert eine Verletzung der Gefäßwand eine lokale Blutstillung durch das Gerinnungssystem, die auf den Ort der Schädigung begrenzt ist.

Störungen im Hämostasesystem führen zur Verschiebung des Gleichgewichtes und resultieren in einer erhöhten Blutungsneigung oder begünstigen die Entstehung von Thrombosen. Eines der existierenden Schemata zur Klassifizierung der Hämostase unterteilt in primäre (zelluläre) und sekundäre (plasmatische) Hämostase. Zellkomponenten und Proteinkomponenten der Hämostase arbeiten hoch koordiniert und voneinander abhängig (Aird, 2005). Zum physiologischen Gleichgewicht zwischen Gerinnungsaktivierung und Gerinnungshemmung trägt auch das fibrinolytische System bei. Dieses bewirkt neben dem Schutz vor übermäßiger Fibrinbildung die Auflösung des Fibringerinnsels an der regenerierten Verletzungsstelle (Spronk et al., 2003).

2.1.1. Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase besteht aus einer Vielzahl von aufeinander abgestimmten Wechselbeziehungen zwischen Gewebekomponenten, Plasmaproteinen und Thrombozyten und erreicht den primären Verschluss einer Gefäßverletzung durch Bildung eines instabilen Thrombozytenthrombus. Ausgelöst wird die primäre Hämostase, sobald infolge der Schädigung einer Gefäßwand Blut mit subendotheliale Gewebe in Kontakt kommt. Wesentliche Prozesse von Thrombozyten während der Bildung eines Plättchenpfropfs sind Adhäsion, Sekretionsvorgänge, morphologische Veränderungen und Aggregation am verletzten Gefäßbereich.

Die primäre Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen vermittelt der von-Willebrand-Faktor (vWF) (Dahlbäck, 2005). Dessen Produktion findet hauptsächlich in Endothelzellen statt. Auch Megakaryozyten produzieren vWF, wodurch das Protein auch in der alpha-Granula von Thrombozyten vorliegt (Lenting et al., 2007). Der vWF ist ein multimeres Glykoprotein aus überwiegend identischen Untereinheiten, die etwa 250 kDa aufweisen. Die Molekülgröße der Proteine erstreckt sich über vWF-Dimere (etwa 500 kDa) bis hin zu Spezies mit mehr als 40 Untereinheiten und über 10 Millionen Da. Der vWF agiert

als Brückenmolekül zwischen Thrombozyten und Subendothel. Diese Adhäsion von Thrombozyten an den Bereich einer Gefäßverletzung vermitteln große vWF-Multimere (high-molecular-weight multimers, HMW) (Sadler et al., 2006). Dabei bindet der vWF zum einen an Kollagenfasern und zum anderen an Thrombozyten über deren Oberflächenrezeptor Glykoprotein Ib-V-IX. Durch Interaktion mit Kollagen und Glykoproteinen des Subendothels tritt die Aktivierung der Thrombozyten ein. An aktivierten Thrombozyten werden während der Adhäsion morphologische Umwandlungen induziert. An der Thrombozytenmembran werden negativ geladene Phospholipide entlassen. Die Ausbildung von Pseudopodien dient der Verankerung weiterer Thrombozyten.

Durch Sekretion von Thromboxan A₂ und der Abgabe von Adenosindiphosphat, Calcium und Serotonin aus der Thrombozytengranula aktivierter Plättchen erfolgt die Aktivierung und Rekrutierung von weiteren Thrombozyten und die Kontraktion der Gefäßmuskulatur.

Weiter finden an aktivierten Thrombozyten Konformationsänderungen von Glykoprotein IIb-IIIa und die Exposition von Bindungsstellen für Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Thrombospondin statt. Diese Proteine formen während der Bildung des Thrombozyten-Aggregats Brücken zwischen Thrombozyten.

Die Ausbildung des instabilen Thrombozyten-Thrombus läuft in zeitlicher Koordination mit dem Vorgang der sekundären Hämostase. Diese setzt bereits während der Thrombozyten-Aggregation ein und führt zu einer Thrombin-Generierung mit nachfolgender Entstehung eines Fibrinnetzes, welches den Thrombus stabilisiert (Dahlbäck, 2005).

2.1.2. Sekundäre Hämostase

In der sekundären Hämostase führt eine Kaskade von Reaktionen der beteiligten Gerinnungsfaktoren zur Bildung von Fibrin. Die Gerinnungsfaktoren zirkulieren im Blut als inaktive Vorstufen (Proenzyme und Pro-Kofaktoren), die in einzelnen Schritten in ihren aktiven Zustand überführt werden. Das Endprodukt Fibrin kann über einen extrinsischen (exogenen) Weg oder intrinsischen (endogenen) Weg gebildet werden. Beide Systeme münden in der Aktivierung von Faktor X (FX), woran sich über eine gemeinsame Endstrecke die Generierung von Thrombin (Faktor IIa, FIIa) und anschließend die Bildung von Fibrin reiht. Als wichtigster Auslöser des Blutgerinnungssystems gilt der exogene Mechanismus durch Tissue-Faktor (TF) (Spronk et al., 2003). Die intrinsische Kaskade ist in erster Linie in vitro im Bereich der Diagnostik von Relevanz. Insgesamt können nach heutiger Ansicht exogene und endogene Kaskade der Hämostase nicht getrennt betrachtet werden. Vielmehr ist der Prozess der Hämostase ein ineinander gefügtes Netzwerk mit eingegliederten positiven und negativen Rückkopplungen (Feedback-Loops) (Gomez und Mc Vey, 2006).

Die Serinproteasen Faktor II (Prothrombin), VII, IX und X sind Vitamin-K-abhängige Proteine. Damit diese Proteine ihre aktive Form erhalten, müssen Glutamat-Reste in einer Vitamin-K-abhängigen enzymatischen Reaktion durch die Gamma-Glutamyl-Carboxylase in Gamma-Carboxyglutamat-Reste umgewandelt werden (Berkner, 2000, Spronk et al., 2003). Einer der Hauptmerkmale der plasmatischen Gerinnung ist, dass die einzelnen Schritte über

die Bildung von multimolekularen Komplexen aus Gerinnungsfaktoren verlaufen, die sich optimal auf negativ geladenen Phospholipiden (PL) anordnen können. Die Membranoberflächen werden gebildet von aktivierten Thrombozyten, Mikropartikeln, Endothelzellen und anderen Zellen.

Die einzelnen Komplexe formen sich aus Vitamin-K-abhängigen Serinproteasen sowie einem nicht enzymatischen Kofaktor und setzen, abhängig von zweiwertigen Calcium-Ionen, Substrate um. Die Substrate der trimolekularen Enzym-Komplexe stellen dabei selber Proenzyme dar, die nach ihrer Aktivierung als Enzymkomponente im nachfolgenden Komplex agieren (Butenas und Mann, 2002).

2.1.2.1. Extrinsisches System

Die Initiierung der Blutgerinnung findet durch Kontakt von aktiviertem Faktor VIIa (FVIIa) mit Tissue Faktor (TF) statt. TF ist ein integrales Membranprotein, welches von zahlreichen Geweben exprimiert wird. Extravaskulärer TF wird dem Blutstrom im Fall einer Verletzung oder Aktivierung des Endothels ausgesetzt. Dies kann eintreten bei einer Perforation der Gefäßwand, durch Chemikalien oder inflammatorische Zytokine. Tissue Faktor und FVIIa, die in aktiver Form bereits in geringen Mengen im Blut vorliegen, formen den FVIIa-TF-Faktor-Komplex (extrinsische Tenase). Dieser Komplex aktiviert FX und Faktor IX (FIX) und fördert auch die Aktivierung von FVII. Die durch die extrinsische Tenase entstandene Menge an aktiviertem FX (FXa) ist begrenzt und bildet aus Prothrombin das Thrombin in einem picomolaren Konzentrationsbereich. Dieses Thrombin kann keine ausreichende Fibrin-Polymerisierung erreichen. Es bewirkt in einem positiven Feedback-Loop die proteolytische Aktivierung der Prokofaktoren Faktor V (FV) und FVIII sowie die partielle Aktivierung von Thrombozyten. Aktivierter Faktor IX (FIXa) formt mit seinem Kofaktor FVIIIa den intrinsischen Tenase-Komplex. Dieser aktiviert FX in einer 100-fach höheren Rate als der FVIIa-Tissue-Faktor-Komplex und ist dabei der Hauptaktivator von FX (Butenas und Mann, 2002).

FXa bildet mit dem Kofaktor FVa den Prothrombinase-Komplex, welcher der primäre Aktivator von Prothrombin ist.

Der intrinsische Tenase- und der Prothrombinase-Komplex führen zur explosionsartigen Bildung von Thrombin und Fibrin. Entstandenes Thrombin verstärkt seine eigene Bildung, indem es Faktor XI (FXI) in einem positiven Feedback-Loop und weiteren FV und FVIII aktiviert. Aktivierter Faktor XIa (FXIa) ist dadurch in der Lage, FIXa-unabhängig vom TF – FVIIa-Komplex zu bilden (Butenas und Mann, 2002). Das gebildete Thrombin ist auch potenter Aktivator von Thrombozyten. Aktivierte Thrombozyten stellen zum einen Phospholipidoberflächen für die Anordnung der Aktivierungs-Komplexe bereit, entlassen aber auch Moleküle der Hämostase, die die Thrombin-Bildung sowohl beschleunigen als auch inhibieren können. Aus der Speichergranula der Thrombozyten werden als prokoagulatorisch wirkende Moleküle FV, FIX, FXI, vWF, Fibrinogen und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1

freigesetzt. Ebenfalls kann der antikoagulatorische Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) abgegeben werden (Gomez und McVey, 2006).

Einer der Hauptfunktionen von Thrombin ist die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Dabei entstehen durch Spaltung Fibrinmonomere, die nach Polymerisierung den primären Thrombozytenthrampus vernetzen und stabilisieren. Eine zusätzliche Stabilisierung des Gerinnsels wird durch die Aktivierung von Faktor XIII (FXIII) durch Thrombin erzielt. Aktivierter Faktor XIII (FXIIIa) bewirkt die kovalente Querverbindung der Fibrinfasern. Die entstandene Abdichtung der Gefäßverletzung erreicht einen dauerhaften Stillstand der Blutung (Crawley et al. 2007).

2.1.2.2. Intrinsisches System

Die Fibrinbildung über die endogene Route besteht aus einer Kaskade an Protease-Reaktionen. Wenn Blut in Kontakt mit anionischen Oberflächen (Kontaktaktivierung) wie Kaolin, Sulfatide, Phospholipide oder Glas (Riddel et al., 2007; Yarovaya et al., 2002) kommt, bildet sich aus Faktor XII (FXII, Hageman Faktor) aktiver Faktor XIIa (FXIIa). High Molecular Weight Kinogen (HMWK) kann als Kofaktor an der FXIIa-Bildung beteiligt sein. Reichert sich eine geringe Menge an FXIIa an, bildet dieser unter Mitwirkung von HMWK aus Präkallikrein (PK) Kallikrein. In einer positiven Rückkopplung beschleunigt das gebildete Kallikrein wiederum die FXIIa-Generierung. Durch FXIIa wird FXI proteolytisch gespalten und entstandener FXIa erreicht seinerseits durch Spaltung die Aktivierung von FIX zu FIXa (Riddel et al., 2007). Der generierte FIXa ist in der Lage, mit FVIIIa den intrinsischen Tenase-Komplex zu formen.

In vivo wird der Kontaktaktivierung allerdings keine ausschlaggebende Rolle zur Auslösung einer physiologisch bedeutsamen Gerinnungsaktivierung zugeschrieben. Ein Mangel an FXII, PK und Kinogen sind beispielsweise nicht mit einem Auftreten von Blutungen verbunden. Des Weiteren ist für die Bildung des intrinsischen Tenase-Komplexes nicht alleine der Mechanismus über die Kontaktaktivierung erforderlich. Wie zuvor aufgeführt, kann FIX direkt durch den extrinsischen TF-FVIIa-Komplex aktiviert werden (sogenannte Joso-Schleife) und FXI kann direkt durch Thrombin aktiviert werden (Spronk et al., 2003).

2.1.3. Inhibitoren der Gerinnung

Zum Schutz vor einer überschießenden Gerinnung sowie zur Herabregulation der Thrombin-Generierung an der Stelle einer Verletzung spielen antikoagulatorisch-wirkende Mechanismen eine wesentliche Rolle. Die wichtigsten Inhibitoren der Blutgerinnung sind TFPI, Antithrombin (AT) und APC.

TFPI greift in die Initiierung der extrinsischen Kaskade der Gerinnung ein. Der Inhibitor TFPI bindet an FXa, inaktiviert diesen und bildet einen quaternären Komplex mit dem TF-FVIIa Komplex. Dadurch ist der extrinsische Tenase-Komplex inaktiviert. TFPI zirkuliert im Blut

gebunden an Lipoproteine. In dieser Formation ist TFPI inaktiv. Der größte Pool an aktiven TFPI ist an der Oberfläche von Endothelzellen lokalisiert. Auch Thrombozyten speichern TFPI.

AT gehört zur Protein-Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Es ist der wichtigste physiologische Inaktivator von Thrombin und hemmt dieses irreversibel durch Komplexbildung (TAT-Komplex). AT alleine hemmt nur wenig effektiv. Das im Organismus vorliegende Glykosaminoglykan Heparansulfat sowie das als Antikoagulant eingesetzte Heparin wirken katalysatorisch auf die Aktivität von AT und steigern dessen hemmende Wirkung auf die Gerinnung. Physiologische Bedeutung hat AT durch Begrenzung des Gerinnungsprozesses auf den Verletzungsbereich. AT inaktiviert des Weiteren andere Serinproteasen. Es hemmt neben Thrombin in erster Linie FXa und außerdem FIXa, FXIa und FXIIa (Gomez et al., 2005).

Auf den inhibierenden Eingriff von APC in den Hämostase-Prozess, der durch proteolytische Inaktivierung der Kofaktoren FVa und FVIIIa erfolgt, wird in nachfolgenden Kapiteln (2.2.5. und 2.3.6.) ausführlich eingegangen.

2.2. Das Protein-C-System

Das während der Blutgerinnung in großen Mengen gebildete Thrombin besitzt eine zentrale Rolle in der Hämostase. Thrombin hat sowohl pro- als auch antikoagulatorische Funktionen, agiert antifibrinolytisch und beeinflusst inflammatorische Prozesse (Crawly et al., 2007). Die wichtigsten prokoagulatorischen Wirkungen entfaltet Thrombin durch die Aktivierungen von FV, FVIII, FXI, FXIII sowie Thrombozyten (Di Cera, 2007). Durch die Aktivierung des im antikoagulatorischen Protein-C-System zentral wirkenden Protein C (PC) wirkt Thrombin hemmend auf die Blutgerinnung. Das Protein-C-System ist ein hocheffektiver Mechanismus, der seine gerinnungshemmende Wirkung über die APC-induzierte Inaktivierung der Kofaktoren FVa und FVIIIa ausübt und hierdurch die Herunterregulierung der prokoagulatorischen Aktivität von Thrombin erreicht. Die Hauptkomponenten des Protein-C-Systems sind Thrombin, Thrombomodulin (TM), endothelialer Protein-C-Rezeptor (EPCR), PC und Protein S (PS) (Esmon, 2003).

Genetische Defekte im Protein-C-System, wie ein heterozygoter PC- oder Protein S-Mangel und die APC-Resistenz, bilden ein Risiko für venöse Thrombosen (Anderson und Spencer, 2003). Die Hauptursache der hereditären APC-Resistenz ist ein an der APC-Spaltstelle Arginin (Arg) 506 mutierter FV/Va (Faktor V Leiden). Der Gendefekt bedingt eine unzureichende Spaltung und Inaktivierung von FVa (Castoldie et al., 2004).

2.2.1. Thrombomodulin

Thrombomodulin ist ein membranständiger Rezeptor auf Endothelzellen. Das Molekül ist eine wichtige Komponente zur Regulierung der Aktivitäten des Gerinnungssystems. So

bewirkt die Bindung von Thrombin an TM eine Änderung der Thrombin-Substratspezifität, wodurch sich dieses in ein antikoagulatorisches Enzym umwandelt. Das endotheliale TM formt hochaffine Komplexe mit Thrombin (Weiler und Isermann, 2003). TM inhibiert unter anderem durch die Blockierung der Thrombin Exosite 1 die prokoagulatorischen Eigenschaften von Thrombin (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

Dem entgegen erhöht der TM-Thrombin-Komplex um mehr als das 1000-fache die Spezifität von Thrombin gegenüber PC und dessen Aktivierung zu APC (Di Cera, 2007).

Thrombomodulin ist auf dem gesamten Gefäßendothel vorhanden. Das Kapillarsystem hat eine besonders hohe Konzentration des Rezeptors und der überwiegende Teil von Thrombin kann infolgedessen fast vollständig durch TM eingefangen und vom Blutgerinnsel entfernt werden. Dadurch wird eine übermäßige intravaskuläre Fibrinogenenerierung durch Thrombin verhindert und eine schnelle Aktivierung von PC erreicht (Esmon, 2003).

2.2.2. Protein C

Das später als Protein C bezeichnete Molekül wurde 1960 von Mammen entdeckt. Unter der Annahme, dass es sich bei dem Molekül um ein Derivat des Prothrombin handelt, erfolgte die Benennung als Autoprothrombin II-a. In voneinander unabhängigen Studien im Jahr 1976 wurde die Vitamin-K-Abhängigkeit des Moleküls und die antikoagulatorische Wirkung des Proteins aufgezeigt, dessen Bezeichnung fortan Protein C lautete (Mather et al., 1996). PC ist das Zymogen von APC, welches im Plasma in einer Konzentration von 40 pM vorliegt (Griffin et al., 2007). Die Synthese von PC ist Vitamin-K-abhängig und findet überwiegend in der Leber statt. Die PC-Produktion erfolgt in Form eines einkettigen Polypeptids. Der größte Teil des gebildeten PC (etwa 80 %) wird durch Entfernung eines Lysin (Lys)-Arginin (Arg)-Dipeptids in ein zweikettiges Molekül gespalten (Perera et al., 2000). Durch eine Disulfidbrücke zwischen den Positionen Cystein (Cys) 141 und Cystein 277 werden die beiden Molekülketten miteinander verbunden. Auf der leichten Kette von PC (Molekulargewicht 25 kDa) liegen die Aminosäurereste 1 bis 155, die schwere Kette (Molekulargewicht 41 kDa) beherbergt die Aminosäurereste 158-419.

Am PC-Molekül ereignen sich posttranslationale Modifikationen, die für die antikoagulatorische Funktion von APC notwendig sind. An der leichten Kette werden die ersten neun Glutamat-Reste durch die Vitamin-K-abhängige Gamma-Glutamyl-Carboxylase in Gamma-Carboxyglutamat-Reste überführt. Die Position Aspartat (Asp) 71 wird modifiziert zu Beta-Hydroxyaspartat. An der schweren Kette erfolgen vier Glykolysierungen an Asparagin (Asn)-Säureresten (Asn97, Asn248, Asn 313, Asn329) (O'Brien et al., 2006).

Die Domänenstruktur der leichten Kette gliedert sich in eine Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Domäne (Gla) und zwei dem Epidermal Growth Faktor (EGF) verwandte Domänen (EGF1 und EGF 2) (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a). Auf der schweren Kette befindet sich das aus 12 Aminosäuren bestehende Aktivierungspeptid. Am C-terminalen Ende der schweren Kette liegt die enzymatische Serin-Proteasen-Domäne mit dem katalytischen Zentrum. Das aktivierte Protein C ist eine Trypsin-ähnliche Serinprotease mit einer hierfür

typischen katalytisch aktiven Triade: Histidin (His)211, Asp257 und Serin (Ser)360 (Mosnier und Griffin, 2006).

Der Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Domäne kommt wesentliche Bedeutung im APC-Molekül zu. Deren posttranslational entstandene Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Reste sind erforderlich für die Bindung von Calcium-Ionen, welche eine strukturelle Umbildung der Domäne bewirken. Die korrekt gefaltete und an Calcium-Ionen gebundene Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Domäne bindet an negativ geladene Phospholipide, die auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten exponiert sind und auf denen APC die prokoagulatorisch wirkenden Kofaktoren FVa und FVIIIa inaktiviert (Preston et al., 2006). Über die an Calcium gebundene Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Domäne erfolgt des Weiteren die Bindung an EPCR, wodurch unter anderem eine effektive PC-Aktivierung ermöglicht wird.

Die Funktionen der EGF-Domänen sind noch nicht vollständig verstanden. Vermutet wird ein Einfluss der Domänen auf die Interaktion mit Proteinen wie FVa, FVIIIa und PS (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a).

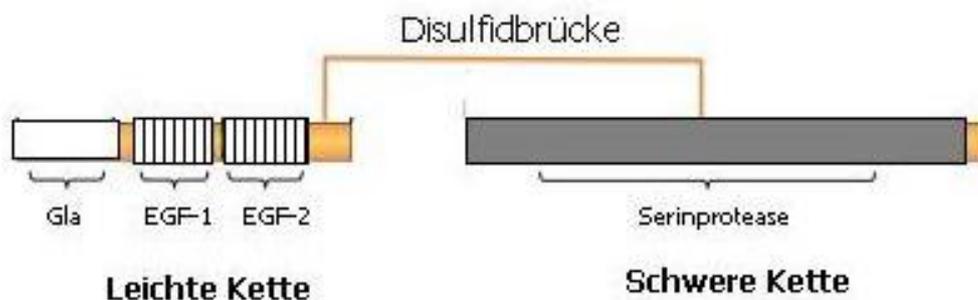


Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen Protein C (modifiziert nach Wikipedia-Die freie Enzyklopädie, Boghog 2011).

2.2.3. Aktiviertes Protein C

Die Aktivierung von PC wird ausgelöst bei der Spaltung durch Thrombin an PC- Position Arg 169 und der daraus resultierenden Entfernung des Aktivierungspeptids (Griffin et al., 2007). Die Rate dieser Reaktion ist um das 1000-fache gesteigert, wenn Thrombin an endotheliales TM gebunden ist (Dahlbäck und Villoutreix, 2005b). Für die Erkennung und Aktivierung von PC durch den Thrombin-TM-Komplex ist die Bindung von Calciumionen an hochaffine Calcium-Bindestellen auf der Oberfläche der Protease-Domäne (Loop 70-80, calcium-binding loop) erforderlich (Bae et al., 2007). Die PC-Aktivierung durch den Thrombin-TM-Komplex kann zusätzlich um das etwa 20-fache gesteigert werden, wenn PC über seine Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-Domäne an endotheliale EPCR gebunden ist (Esmon, 2003). Das EPCR-Molekül beschleunigt die Thrombin-induzierte PC-Aktivierung, indem es die

Ausrichtung des Zymogens zur Gefäßoberfläche und dadurch die Orientierung zum Thrombin-TM-Komplex bewirkt.

Generiertes APC bleibt kurzzeitig an EPCR gebunden. Dissoziiertes APC bildet auf Endothel oder Thrombozyten mit PS Komplexe und spaltet dort FVa/VIIIa. Das vorübergehend an EPCR gebundene APC besitzt eine andere Substratspezifität. Dieses mit EPCR assoziierte APC-Molekül kann Protease-aktivierter Rezeptor 1 spalten, wodurch zytoprotektive Zellsignale initiiert werden. Neben einer antikoagulatorischen Funktion besitzt APC somit auch zytoprotektive Eigenschaften, die anti-inflammatorische und antiapoptotische Aktivitäten beinhaltet (Griffin et al., 2007).

Plättchenfaktor 4 kann ebenfalls eine Erhöhung der APC-Bildung erreichen. Plättchenfaktor 4 ist ein Protein aus der alpha-Granula von Thrombozyten, welches eine Erhöhung der Affinität von PC für den Thrombin-TM-Komplex bewirkt (Van de Wouwer et al., 2004).

2.2.4. Protein S

Protein S ist ein Vitamin-K-abhängiges Glykoprotein. Seine Synthese findet in erster Linie in der Leber aber auch in Endothelzellen und möglicherweise auch in Megakaryozyten statt.

PS besitzt eine hohe Affinität für negativ geladene Phospholipidmembranen und formt einen membrangebunden Komplex mit APC. Dabei wirkt PS als Kofaktor von antikoagulatorisch aktivem APC bei der Inaktivierung von FVa und FVIIIa. Die APC-Bindestelle befindet sich vermutlich auf der EGF 1-Domäne von PS. Ebenfalls beteiligt an der Wechselwirkung mit APC sind Gamma-Carboxy-Glutaminsäure-, EGF 2 - und die Thrombin-sensitive Domäne des PS-Moleküls. In der Zirkulation sind etwa 60-70 % des PS in einem nicht-kovalenten Komplex reversibel an Komplementfaktor C4b gebunden. Die Komplexbildung führt zum Verlust der APC-Kofaktor-Funktion von PS. Vermutet wird, dass PS den Abstand zwischen dem aktiven Zentrum des APC-Moleküls und der Membran von Phospholipiden verkürzt. Dies kann wichtig sein für die geeignete Anordnung von APC im Hinblick auf die Spaltstellen an FVa und FVIIIa (Dahlbäck und Villotrex, 2005b).

2.2.5. Antikoagulatorische Aktivität von APC

Aktiviertes Protein C bindet an anionische Phospholipide auf der Oberfläche von Endothelzellen. Dort bildet APC mit seinen Kofaktoren multimolekulare Komplexe und inaktiviert seine Substrate FVa und FVIIIa durch enzymatische Proteolyse.

Am FVa-Molekül spaltet APC drei Peptidbindungen an den Positionen Arg306, Arg506 und Arg679. Die Proteolyse an Arg506 ist kinetisch begünstigt und erfolgt unabhängig von PS. Nach dieser Spaltung verbleibt dem FVa durch eine reduzierte FXa-Kofaktor-Aktivität noch eine restliche prokoagulatorische Aktivität. Die weitere APC-induzierte Spaltung an Arg306 wird durch PS gefördert und führt zur Dissoziation der A2-Domäne des FVa-Moleküls. Durch die Spaltungen wird die vollständige Inaktivierung von FVa erreicht. Die Proteolyse an

Arg679 scheint für die FVa-Inaktivierung von geringer Bedeutung zu sein (Dahlbäck und Villoutreix, 2005a; Sun et al., 2004).

An der FVIIIa-Inaktivierung ist neben PS auch FV als APC-Kofaktor beteiligt. Der genaue Ablauf wird im Kapitel 2.3.6. beschrieben.

2.2.6. Regulation der APC-Aktivität im Plasma

Die Regulation der APC-Aktivität im Plasma findet hauptsächlich durch die Serpine Protein C-Inhibitor (PCI), α 1-Proteinase-Inhibitor und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 statt. Einfluss auf die Aktivität von APC im Plasma hat wahrscheinlich auch das nicht zur Familie der Serpine zählende α ₂-Makroglulin (Rezaie, 2003).

Den bedeutensten physiologischen Inhibitor von APC stellt PCI dar. Die inhibitorische Aktivität von PCI kann hierbei durch die Anwesenheit des Glykosaminglykans Heparin entscheidend gesteigert werden. So binden APC und PCI an ein gemeinsames Heparin-Molekül, was zur Ausbildung eines ternären Komplexes führt (Huntington und Li, 2009). Hierbei ist der zu beachtende beschleunigende Effekt proportional zum Molekulargewicht des beteiligten Heparin-Moleküls (Aznar et al., 1996). Dabei konnte eine minimal notwendige Länge von 8 Monosacchariden identifiziert werden (Li et al., 2007).

2.3. Faktor VIII

2.3.1. Faktor VIII-Gen

Das humane FVIII-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms X in der Region Xq28 lokalisiert und zirka 186 Kilobasen groß. Die genetische Information erstreckt sich auf 26 Exons, die eine messenger RNA von zirka 9 Kilobasen codieren. Zwischen den codierten DNA-Sequenzen liegen als nichtcodierende Nukleotidfolgen 25 Introns. Das FVIII-Vorläuferprotein umfasst 2351 Aminosäuren (AS), von dem ein Signalpeptid aus 19 Aminosäuren abgespalten wird (Bowen, 2002).

2.3.2. Faktor VIII-Protein

FVIII wird als Einzelketten-Polypeptid aus 2332 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa sezerniert. Die Hauptsynthese des Proteins findet in der Leber in sinusoidalen Endothelzellen statt. Vermutet wird, dass die Produktion von FVIII auch in Milz, Lunge und Niere erfolgt (Lenting et al., 2007). Der normale FVIII-Spiegel im Plasma beträgt 1 nmol/L (Vlot et al., 1998). Das FVIII-Molekül besteht aus einer Domänenstruktur, die sich aufgrund interner Sequenzhomologien in A-, B-, und C-Domänen gliedert. Angeordnet sind diese in der Reihenfolge A1 (AS 1-336), A2 (AS 373-710), A3 (AS 1690-2019), B (AS 741-

1648), C1 (AS 2020-2172) und C2 (AS 2173-2332). Diese Struktur ist identisch mit der Domänenanordnung im FV-Molekül.

Die A-Domänen weisen untereinander eine Homologie von etwa 30 % auf und zeigen außerdem auch Homologien zu FV und dem kupferbindenden Plasmaprotein Ceruloplasmin. Auch die Sequenzen der C-Domänen sind ähnlich wie die C-Domänen von FV.

Im Gegensatz hierzu besitzt die Aminosäuresequenz der B-Domäne weder Homologien zur B-Domäne von FV, noch zu anderen Proteinen. Die Domäne hat einen hohen Gehalt an Glykosylierungen über Stickstoffbindungen.

Die Struktur von FVIII weist zwischen den Domänen saure Regionen (a1, a2, a3) auf, die eine hohe Dichte der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure besitzen (Lenting et al., 1998). Das Segment a1 (AS 337-372) schließt sich unmittelbar an die A1-Domäne und a2 (AS 711-740) unmittelbar an A2 an. Vor A3 befindet sich a3 (AS 1649-1689). Insgesamt ergibt sich somit die nachfolgende Domänenstruktur von Faktor VIII (NH₂)-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (COOH) (Abb. 2).

Von den stattfindenden posttranslationalen Modifikationen am FVIII-Molekül ist die Sulfatierung von Tyrosinresten innerhalb der sauren Regionen a2 und a3 erforderlich für die biologische Funktion des FVIII. Diese tragen zur Kofaktor-Funktion und vWF-Bindung bei (Fay, 2004).

Infolge von intrazellulären Proteolysen während der Sekretion in die Blutbahn ist der zirkulierende FVIII ein heterodimeres Molekül aus leichter und schwerer Kette. Die Spaltung an Arg1648 zwischen den Domänen B und A3 führt zur Entstehung dieser heterodimeren Form. Im Plasma sind vor der FVIII-Aktivierung zusätzliche Thrombin-induzierte Proteolysen zwischen Aminosäurerest 741 und 1313 möglich (El-Maarri et al., 2005). Dadurch besteht FVIII im Blut aus einheitlich aufgebauten leichten Ketten mit A3-C1-C2 (80 kDa) sowie heterogen ausgebildeten schweren Ketten, die unterschiedlich große oder gar keine B-Domänen aufweisen. Die minimale Größe der schweren Kette aus A1-A2-Domänen hat ein Molekulargewicht von 90 kDa. Abhängig vom Ausbildungsgrad der B-Domäne kann sich das Molekulargewicht der Kette bis hin zu 210 kDa erstrecken (Vlot et al., 1998).

Über ein zweiwertiges Metall zwischen A1 und A3 sind leichte und schwere Kette nicht-kovalent verbunden. Vermutlich handelt es sich hierbei um Kupferionen. Für die Ausbildung der FVIII-Kofaktor-Aktivität sind außerdem zweiwertiges Calcium und Magnesium essentiell, die die Konformation des Heterodimers beeinflussen (Fay, 2004).

Für die prokoagulatorische Aktivität von FVIIIa als Kofaktor bei der FXa-Generierung ist die B-Domäne nicht erforderlich (Toole et al., 1986, Pipe et al., 2005). Die B-Domäne ist stark glykosyliert. Im Bereich der FVIII-B-Domäne befinden sich 18 Stickstoff-Glykosylierungsstellen von Asparagin. Im Vergleich zum Vollängen-Molekül bildet B-Domäne-deletierter (BDD) FVIII (BDD-FVIII) eine höhere Rate an messenger-RNA-Generierung und des primären Translations-Produktes. Dennoch weist BDD-FVIII keine stark gesteigerte Sekretionsrate auf (Pipe et al., 2005). Es wurde festgestellt, dass die B-Domäne wesentliche Bedeutung bei der intrazellulären Biosynthese von FVIII hat. Durch die Interaktion mit Chaperon-Proteinen ist die B-Domäne intrazellulär an der Faltung und

Sekretion des FVIII beteiligt (Makogoneneko et al., 2005). Relevant ist diese Domäne auch für den intrazellulären Transport des FVIII vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Zhang et al., 2005). Untersuchungen zeigten, dass die Effizienz der Sekretion des FVIII-Proteins von der Größe und vom Oligosaccharid-Gehalt der B-Domäne abhängig ist (Pipe et al., 2005). Wahrscheinlich ist die B-Domäne auch beteiligt an der FVIII-Clearance über Asialoglycoprotein-Rezeptor, der die Endozytose aus dem Blut vermittelt (Makogoneneko et al., 2005).

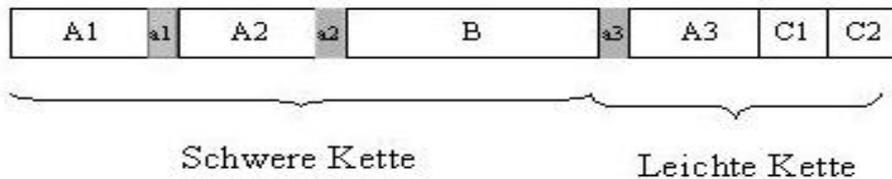


Abbildung 2: Anordnung der FVIII-Domänen auf schwerer und leichter Kette (modifiziert nach Ngo et al., 2008).

2.3.3. Faktor VIII-vWF

Im Blut zirkulieren 95-98 % des FVIII in einem nicht-kovalenten Komplex mit seinem Trägerprotein vWF (Lenting et al., 2007). FVIII bindet an vWF mit hoher Affinität, ermittelt wurde eine Dissoziationskonstante (K_d) von 0,3 nM. Die Bindungsregionen des vWF an das FVIII-Molekül liegen im Bereich der leichten Kette. An der aminoterminalen Region der leichten Kette bindet vWF im Bereich der Aminosäurereste 1649-1689. Am carboxyterminalen Ende sind die Positionen 2303-2332 in C2 als weiterer Bindungsbereich für vWF ermittelt worden. Neuere Untersuchungen vermuten einen sich auf a3-C1-C2 ausdehnenden Interaktionsbereich von vWF an FVIII (Fay, 2004).

Für seine Funktion als FVIII-Trägerprotein ist die Größe des vWF-Moleküls nicht entscheidend und nicht nur high-molecular-weight Multimere sind für diesen Vorgang von Bedeutung. Jedes der vWF-Monomere ist in der Lage, ein FVIII-Molekül zu binden. In vivo tragen jedoch nur 1-2 % der vorliegenden vWF-Monomere FVIII (Castaman et al., 2003). Die Halbwertszeit von FVIII in der Zirkulation hängt entscheidend von der Bindung an vWF ab. Durch den Komplex mit vWF erhöht sich die FVIII-Halbwertszeit von 2-3 Stunden auf 12-14 Stunden (Kaufman und Pipe, 1999). Die Wirkung des vWF beruht auf einer Reihe von Mechanismen. Zum einen erhöht vWF die Stabilität der Interaktion von leichter und schwerer Kette. vWF schützt FVIII außerdem vor proteolytischem Abbau durch Phospholipid-bindende Proteasen wie APC und FXa. Des Weiteren stört vWF die Bindung von FVIII an negativ geladene Phospholipidoberflächen, z.B. an Thrombozyten. Außerdem inhibiert vWF die Bindung von FVIII an FXa, wodurch dessen Beitritt zum FX-Aktivierungskomplex verhindert wird. Nicht an vWF gebundener FVIII, der frei im Blut zirkuliert, wird schnell abgebaut über

die Aufnahme durch Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 ist ein zellulärer Membranrezeptor der Low Density Lipoprotein-Rezeptorfamilie. Die Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1-vermittelte Entfernung von freiem FVIII aus der Blutbahn wird unterstützt durch weitere Rezeptoren, die ebenfalls die Fähigkeit zur Aufnahme von FVIII besitzen. Dabei handelt es sich in erster Linie um LDL-Rezeptor und Heparansulfat-Proteoglykane (Lenting et al., 2007).

2.3.4. Faktor VIII-Aktivierung

Das FVIII-Heterodimer hat keine biologische Aktivität. Aktiv wird der Prokofaktor FVIII nach limitierter proteolytischer Aktivierung durch Thrombin und FXa. Gebildeter FVIIIa kann als Kofaktor von FIXa im Tenase-Komplex wirken (Lentling et al., 1998). Thrombin gilt als physiologischer Hauptaktivator von FVIII (Eaton et al., 1986a; Pieters et al., 1989). Im Vergleich zur Aktivierung durch FXa bewirkt die Aktivierung durch Thrombin eine höhere prokoagulatorische Aktivität des FVIII (Nogami et al., 2000; Parker et al., 1997).

Während der Thrombin-vermittelten FVIII-Aktivierung finden Proteolysen an 3 Arg-Serpeptid-Bindungen (Arg740, Arg372 und Arg1689) innerhalb des FVIII-Moleküls statt (Eaton et al., 1986a; Regan und Fay, 1996). Im Zuge der Spaltung an Arg740 wird die B-Domäne, beziehungsweise ihre Fragmente, von der schweren Kette entfernt und mit der Spaltung an Position Arg372 werden die A1 - und A2-Domänen getrennt. Dadurch bilden sich 50-kDa A1 und 40-kDa A2 Untereinheiten. Mit weiterer Proteolyse an Aminosäureposition Arg1689 in der leichten Kette wird die saure Region a3 am aminoterminalen Ende von A3 frei, wodurch eine 70- kDa A3-C1-C2-Untereinheit hervorgeht (Bhopale und Nanda, 2003; Eaton et al., 1986a; Myles et al., 2002). Für den Prozess der Thrombin-vermittelten FVIII-Aktivierung wird eine geordnete Abfolge der drei Spaltungen vermutet. Die Proteolyse an Arg740 wird als initialer Vorgang betrachtet, der die übrigen Spaltvorgänge an den Positionen Arg372 und Arg1689 erleichtert und effiziert (Newell und Fay, 2007).

Eine wesentliche Bedeutung bei der FVIII-Aktivierung besitzen Exosite I (Anion-binding-exosite I) und Exosite II (Anion-binding-exosite II) des Thrombin-Moleküls. Exosite I und Exosite II sind Erkennungsdomänen, über die Thrombin makromolekulare Substrate und Kofaktoren erkennt. Diese Regionen liegen abseits des aktiven Zentrums und sind durch eine hohe Dichte basischer Reste charakterisiert. Wichtig für die Spaltvorgänge an den FVIII-Positionen Arg372 und 1689 ist Exosite I. Exosite II scheint hingegen von größerer Bedeutung für die Spaltung an Arg 372 zu sein. Einfluss auf die FVIII-Aktivierung hat außerdem der 50er-Insertionloop von Thrombin. Auch die Bindung von Natriumionen an der Natrium-Bindestelle des Thrombin-Moleküls wirkt sich auf die Vermittlung der FVIII-Aktivierung aus. Sind Natriumionen an Thrombin gebunden, besitzt dieses eine höhere Effizienz bei der Spaltung von FVIII und auch FV (Myles et al., 2002).

Als eine der Bindungsstellen für Thrombin an FVIII wurde die C2-Domäne der leichten Kette identifiziert. Die Bindung von Thrombin an diesen FVIII-Bereich ist für die Proteolyse an

Arg 1689 verantwortlich (Nogami et al., 2000). Weitere Resultate weisen darauf hin, dass mit Natrium besetzte Thrombin-Moleküle signifikant höhere Affinitäten für die Interaktion mit A1 im Vergleich zum Kontakt zur A2-Domäne besitzen. Die Wechselwirkung mit der A2-Domäne des FVIII-Moleküls scheint hingegen relativ unabhängig davon zu sein, ob Natriumionen an Thrombin gebunden sind. Vermutet wird außerdem, dass die Region 389-394 in der A2-Domäne mit Thrombin über deren Exosite II interagiert, wodurch die Spaltung an Position 740 von FVIII vermittelt wird (Nogami et al., 2005).

Auch FXa aktiviert FVIII durch limitierte Proteolyse an den Spaltstellen Arg372, Arg740 und Arg1689. Zusätzlich spaltet FXa an Position Arg1721 (Saenko et al., 1999). Der bei der Thrombin-vermittelten FVIII-Aktivierung beobachtete geordnete Ablauf der Proteolysen, der eine initiale Spaltung an Arg740 zeigte, wurde beim Vorgang der FXa-induzierten Proteolysen in einem weniger starken Ausmaß festgestellt. Vermutet wird daher, dass verschiedene Mechanismen bei der FVIII-Aktivierung durch Thrombin und FXa existieren (Newell und Fay, 2007).

2.3.5. Faktor VIIIa

FVIIIa ist ein ein heterotrimeres Protein aus den Untereinheiten A1, A2 und A3-C1-C2. Zwischen den A1 und A3-C1-C2-Untereinheiten verbleibt die Metallionenbindung. Die A2-Untereinheit ist mit dem A1-A3-C1-C2-Dimer nur schwach über elektrostatische Wechselwirkungen assoziiert. Die Verbindung von A2 mit dem Dimer ist reversibel. Etwa 90 % der Bindungsenergie für die Assoziation von A2 mit dem Heterodimer stammt aus der Interaktion mit A1.

Bei der Spaltung an Position 372 wird eine Stelle für die Interaktion mit FIXa freigelegt (Fay et al., 2001). Durch Abspaltung von a3 bei der Proteolyse an Arg1689 wird FVIII von seinem Trägerprotein vWF entlassen (Lollar et al., 1988; Nogami et al., 2000). Infolge der Trennung vom vWF ist FVIII in der Lage, an anionische Phospholipidoberflächen (auch Thrombozyten) zu binden.

Der gebildete FVIIIa besitzt die Fähigkeit, FIXa zu binden und als dessen Kofaktor im Tenase-Komplex zu wirken. Durch FVIIIa wird der durch FIXa katalysierte Umsatz von FX zu FXa in einer Größenordnung von einigen Zehnerpotenzen beschleunigt (Fay, 2004; Rosenblum et al., 2002; Van Dieijen et al., 1981). Der genaue Mechanismus der Kofaktor-Aktivität von FVIII im intrinsischen Tenase-Komplex ist immer noch unzureichend aufgeklärt (Fay, 2004).

Die Anordnung des intrinsischen Tenase-Komplexes wird durch Protein-Lipid und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die Bindung von FVIIIa und FIXa an negativ geladenen Phospholipid-Oberflächen erfolgt mit hoher Affinität (Kd-Werte ~ 1 nM und ~ 15 nM). Die für die Interaktion mit FIXa entscheidenden Bereiche im FVIIIa-Molekül befinden sich wahrscheinlich in A2 und A3. An A3 wurde der Aminosäurebereich von R 811 bis 1818 identifiziert. In der A2-Untereinheit R 484-509 und R 558-565. Nur wenige Einblicke liegen

zur Verbindung von FVIIIa mit FX vor. Ermittelt werden konnte als Faktor X-Bindungsstelle der Bereich R 336- 372 von FVIIIa (Fay, 2004).

Zwei Funktionen des FVIIIa als Kofaktor bei der FX-Aktivierung, die bereits früh festgestellt wurden, sind die Erhöhung der katalytischen Konstante der Generierungsreaktion und die Steigerung der Menge an Phospholipid-gebundenem FIXa. Es wurde gezeigt, dass eine positive Korrelation zwischen der Rate der FXa-Generierung und der FX-Bindung an FVIIIa besteht. Deshalb wurde eine regulatorische Rolle des FVIIIa-FX-Komplexes bei der FX-Aktivierung angenommen. Diese Annahme stimmte mit der Feststellung überein, dass die angezeigte Michaelis-Konstante der FX-Aktivierung von der FVIIIa-Konzentration abhängig ist. Die Autoren der entsprechenden Studie vermuten, dass der Regulationsmechanismus der FXa-Generierung durch den FVIIIa-FX-Komplex darin besteht, Substrat (FX) an der Phospholipidmembran bereitzustellen. Außerdem wird die Hypothese angebracht, dass der FVIIIa-FX-Komplex, und nicht FX, das tatsächliche Substrat bei der FX-Aktivierungsreaktion ist (Panteleev et al., 2005).

2.3.6. Faktor VIIIa-Inaktivierung

Die Aktivität von FVIIIa ist nur wenig stabil und zerfällt bei physiologischem pH-Wert spontan. Ursache für die Instabilität des FVIIIa ist die spontane Dissoziation der A2-Untereinheit. Die Ablösung von A2 vom aktivierten Molekül ist ein reversibler Prozess, der eine FVIIIa-Halbwertszeit von etwa 2 Minuten bewirkt (Parker et al., 2006). Dieser FVIIIa-Inaktivierungsprozess stellt den primären Vorgang dar, der zur Abschwächung des intrinsischen Tenase-Komplexes führt. Der APC-induzierten irreversiblen FVIIIa-Inaktivierung durch Proteolyse wird kein großer Anteil an der Herunterregulierung des Tenase-Komplexes zugeschrieben. Demgegenüber ist die APC-induzierte FVa-Inaktivierung vermutlich weitestgehend für die Verringerung der Aktivität des Prothrombinase-Komplexes verantwortlich.

APC spaltet FVIIIa an Aminosäure-Resten Arg336 der A1-Domäne und Arg562 in der A2-Domäne. Beide Spaltvorgänge am FVIIIa-Molekül wirken sich auf die enzymatische Aktivität von FIXa bei der FXa-Generierung aus. Die Spaltung an Arg336 verändert die Wechselwirkung zwischen den FVIIIa-Untereinheiten A1 und A2, was sich unter anderem in reduzierten Werten der katalytischen Konstanten der FX-Aktivierung durch den intrinsischen Tenase-Komplex auswirkt (Fay, 2004). Die Proteolyse an Arg562 findet an einer entscheidenden Stelle für den Kontakt zwischen FVIIIa mit FIXa über dessen Loop 558-565 statt (Fay, 2004).

In einer jüngeren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Spaltung an Arg336, im Gegensatz zur Proteolyse an Position 562, keine vollständige Inaktivierung von FVIIIa erreicht (Gale et al., 2008). In der Studie von Gale et al. (2008) konnten die APC-vermittelten proteolytischen Spaltungen sowohl isoliert voneinander als auch separiert von der FVIIIa-Inaktivierung aufgrund von Dissoziation der A2-Untereinheit analysiert werden. Die Einführung einer Disulfidbrücke zwischen den A2- und A3-Untereinheiten in FVIII-

Variante verhindert die spontane Ablösung von A1 vom FVIIIa-Molekül. Die proteolytische Spaltung an Arg336 ereignete sich in der Untersuchung dabei mit einer 6-fach höheren Geschwindigkeit. Bereits eine frühere Studie konnte eine schnellere Spaltung an Arg336 durch APC als an 562 ermitteln (Varfay et al., 2006). Diese Studie analysierte weiterhin den Einfluss der in vivo vorliegenden APC-Kofaktoren PS und FV auf die FVIIIa-Inaktivierung durch APC. Sowohl PS als auch FV bewirken eine Erhöhung der Proteolyse an beiden APC-Spaltvorgängen. FV erreicht eine Steigerung der Spaltungsrate allerdings nur in Gegenwart von PS. Beide APC-Kofaktoren erzielen eine größere Steigerung der Spaltungen an Arg562. Insgesamt ergab die Studie, dass in Gegenwart beider APC-Kofaktoren, die Proteolyse an Position 336 nur 2-fach schneller abläuft als an Arg562, weshalb beiden Spaltungen eine signifikante Bedeutung bei der FVIII-Inaktivierung zugeschrieben wird.

Fähig zur proteolytischen FVIIIa-Inaktivierung sind auch FXa und FIXa. Beide Proteasen spalten FVIIIa an Position Arg336. Die Spaltung durch FIXa geschieht über einen verlängerten Zeitverlauf und wurde erst bei einer hohen Konzentration der Protease beobachtet. FXa spaltet zusätzlich an Lys36 der A1-Untereinheit und weist langsame katalytische Raten für die Spaltvorgänge an FVIIIa auf. Die Proteolyse an Lys36 verändert vermutlich die Konformation der A1-Untereinheit von FVIIIa, wodurch die Affinität der A1- für die A2-Untereinheit beeinflusst wird. Der physiologische Stellenwert der FVIIIa-Inaktivierung durch FXa-induzierte Proteolyse verbleibt noch zu bestimmen. Es existiert die Annahme, dass FXa in vivo zur Abschwächung der Aktivität des intrinsischen Tenase-Komplexes beiträgt (Fay, 2004).

2.4. Hämophilie A

Die Hämophilie A ist eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Blutgerinnungsstörung. Ihre Ursache sind Mutationen im FVIII-Gen, die zu einem Mangel oder Dysfunktion von FVIII führen. Als Folge liegt im Organismus eine verringerte FVIII-Aktivität vor. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt etwa 1:10000 Geburten (Manucci, 2002). Begründet durch die X-chromosomal-rezessive Vererbung, leiden in der Regel Jungen und Männer an der Erbkrankheit, deren X-Chromosom die mutierte Erbanlage trägt. Frauen sind überwiegend Überträgerin der Hämophilie A (Plug et al., 2006).

Unterschieden werden verschiedene Schweregrade der Hämophilie A, die der verbleibenden FVIII-Restaktivität zugeordnet werden. Leichte Form (FVIII-Restaktivität 6-30 %), mittelschwere Form (FVIII-Restaktivität 1-5%) und schwere Form (FVIII-Restaktivität unter 1 %). Patienten mit der schweren Form der Hämophilie A zeigen häufig Spontanblutungen und Blutungen nach unbedeutenden Traumata, die sich vorzugsweise in Muskeln und Gelenken ereignen (Manucci, 2002). Der Normbereich liegt bei einer FVIII-Restaktivität von 70-150 %.

Die der Hämophilie A zu Grunde liegenden genetischen Defekte sind in über 90 % der Patienten Nonsense- oder Missense-Punktmutationen und bei etwa 5-10 % der erkrankten

Personen Deletionen. Seltener Mutationstypen sind Insertionen und chromosomale Rearrangements wie Inversionen. Ausnahme ist die Intron-22-Inversion, die bei Patienten mit schwerer Hämophilie A der häufigste Molekulardefekt ist (Bowen, 2002). Bereits mehr als 200 Mutationen im FVIII-Gen sind bisher identifiziert worden. Eine Datenbank der verschiedenen Mutationstypen der Hämophilie A kann über Internet eingesehen werden (Manucci, 2002). Die verschiedenen Mutationstypen können zu Defekten in der Expression, Sekretion, und/oder Halbwertszeit von FVIII in der Zirkulation führen. Manche Hämophilie A-Mutationen bilden stabilen aber dysfunktionalen FVIII (Shen et al., 2007).

Basis der Behandlung der Hämophilie A ist die intravenöse Substitution von FVIII. Durch die Entwicklung von hochgereinigten pbFVIII-Konzentraten aus Spenderplasmen, gelang in den 1970er Jahren ein grundlegender Fortschritt, der den Beginn der modernen Substitutionstherapie bedeutete (Mannucci, 2003). Neben der prophylaktischen Therapie wird die On-Demand-Therapie unterschieden. Die On-Demand-Therapie ist eine Bedarfsbehandlung, bei der FVIII im Fall von auftretenden Blutungen appliziert wird (Oldenburg und Barthels, 2008; Srivastava, 2002).

Die Kontamination von Plasma-FVIII-Konzentraten mit Krankheitserregern stellt ein potentiell Infektionsrisiko für Hämophilie A-Patienten dar. Insbesondere die Übertragung von HIV- und Hepatitis C-Viren erforderte Anfang der 80er Jahre die Einführung von Virus-inaktivierenden Verfahrensschritten in den Herstellungsprozess der FVIII-Konzentrate (Mannucci et al., 2001). Seit Anfang der neunziger Jahre stehen rFVIII-Präparate zur Verfügung. Möglich wurde die In-vitro-Expression von humanem FVIII durch die Aufklärung der Struktur des FVIII-Gens 1984 sowie erreichten Fortschritten in den molekularbiologischen Technologien (Pipe, 2005; Saenko et al., 2003). Mit Refacto (Wyeth) steht seit 1999 auch ein kommerzielles B-Domänen-deletiertes rekombinantes FVIII-Präparat (BDD-rFVIII) zur Verfügung. Die Produktion von rekombinantem FVIII erfolgt in tierischen Baby Hamster Nieren – oder Chinese Hamster Ovar-Zellkulturen. Entsprechend der Zusätze von tierischen oder menschlichen Proteinen (in der Zellkultur oder als FVIII-Stabilisator) gehören rekombinante Präparate verschiedenen Produkt-Generationen an (UKHCDO, 2003). In der dritten Generation (Advate, Baxter) sind diese Proteine weder in der Zellkultur noch in den einzelnen Herstellungsschritten eingesetzt worden (Kessler, 2005).

Bei etwa 30 % der Patienten mit schwerer und mittelschwerer Hämophilie A entwickeln sich Alloantikörper gegen infundierten FVIII. Die Immunreaktion tritt im Allgemeinen innerhalb des ersten Jahres der Substitutionstherapie auf (Lollar, 2004).

Der Gehalt an FVIII wird in Internationalen Einheiten (IE, International Units, IU) pro ml Ampulleninhalt angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Angabe auch in IE/ml. Definiert ist eine IE FVIII-Aktivität als diejenige Menge, die in 1 ml normalem Humanplasma vorliegt. Die Angabe durch die Maßeinheit Prozent findet bei der laborchemischen Bestimmung der FVIII-Aktivität, hauptsächlich zur Untersuchung von Patientenproben, Anwendung. Dabei handelt es sich um Relativprozente, die sich auf ein Standard-Normalplasma beziehen. Zur Beschreibung der spezifischen Aktivität der FVIII-Präparate gilt die Definition IE/mg Protein, nach der sich die Präparate auch in verschiedene Reinheitsgrade

unterscheiden lassen. Hochgereinigte Konzentrate weisen FVIII in sehr hoher Konzentration auf. Andere Proteine als FVIII sind nur in sehr geringer Mengen bzw. gar nicht vorhanden. Die Konzentrate sind rekombinant hergestellt oder hochgradig gereinigt (z.B. mit monoklonalen Antikörpern). FVIII-Konzentrate mit mittlerem Reinheitsgrad enthalten als weiteren Faktor vWF in einer nicht standardisierten Menge (Barthels und Schramm, 2004). Das in dieser Arbeit eingesetzte Produkt Haemate HS (Dade Behring) stellt eine Ausnahme dar und beinhaltet einen standardisierten Gehalt vWF. Dieses FVIII-Konzentrat ist sowohl zur Behandlung der Hämophilie A als auch zur Behandlung des von-Willebrand-Syndroms zugelassen.

Die verschiedenen Reinheiten der FVIII-Konzentrate sind das Ergebnis von unterschiedlichen Verfahrensmethoden, die zur Reinigung und Fremdproteinentfernung sowie zur Virusinaktivierung- und Reduzierung angewendet werden. Wesentliche Verfahren bei der Herstellung von FVIII-Präparaten sind Präzipitationen (pbFVIII) und verschiedene Formen der Chromatographie. Allen derzeit erhältlichen rFVIII-Präparaten ist gemeinsam, dass sie unter anderem mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei werden murine monoklonale Antikörper gegen humanen FVIII eingesetzt. Hauptmaßnahmen, die zur Eliminierung und Reduzierung von Viren angewendet werden, sind Filtrationen, Solvent-Detergens-Verfahren, Pasteurisierungen und Trockenhitzebehandlungen. Diese Techniken schützen vor der Übertragung von lipid-umhüllten Viren. Nicht-umhüllte Pathogene wie Parvovirus B19 können die Prozesse überleben (Key und Negrier, 2007; UKHCDO, 2003).

2.5. Aptamere

2.5.1. Aptamere und ihre funktionellen Eigenschaften

Aptamere sind kurze, einzelsträngige (ss, single-stranded) Nukleinsäuren (ssDNA oder ssRNA-Moleküle). Der Begriff Aptamer entstammt dem lateinischen Wort „aptus“ (passend) und dem Griechischen „meros“ (Teilchen) (Mayer und Famulok, 2007). Aptamere falten eine spezifische dreidimensionale Struktur, die es ihnen ermöglicht, genau passend an ihr Zielmolekül (Target) zu binden (Jayasena, 1999). Im Jahr 1990 berichteten die beiden Forschungsgruppen Ellington und Szostak (1990) sowie Tuerk und Gold (1990) erstmals von der Entwicklung von RNA-Aptameren. Bis heute sind Aptamere gegen eine Bandbreite von Molekülen gewonnen worden. Selektiert wurden Aptamere gegen kleine Zielmoleküle wie (beispielsweise) Metallionen, Nukleinbasen, Aminosäuren, Aminoglycoside, Farbstoffe, Antikörper, Antibiotika, Peptide, Aminosäuren, biologische Kofaktoren, wie z.B. Nikotinamidadenindinukleotid, Proteine und auch lebende Zellen und Viren. Die Generierung von Aptameren erfolgt durch einen In-vitro-Selektions- und Amplifikationsprozess, der als SELEX (Systematic Enrichment of Ligands by Exponential Amplification) bezeichnet wird (siehe Punkt 2.5.4.).

Aptamere kennzeichnen sich durch eine hohe Target-Spezifität. Der hohe Grad der Spezifität ermöglicht es Aptameren, selektiv ihr Zielmolekül zu binden und auch eng verwandte Moleküle von diesem zu unterscheiden. Unterschieden werden können bereits D- und L-Enantiomere chiraler Moleküle und kleine strukturelle Veränderungen wie Methyl- und Hydroxylgruppen (Jayasena, 1999).

Aptamere binden ihr Zielmolekül mit hoher Affinität. Die Dissoziationskonstanten liegen hierbei im picomolaren bis nanomolaren Bereich (Becker et al., 2005; Nimjee et al., 2005b). Aptamer-Affinität und Aptamer-Spezifität können während des Selektionsvorgangs moduliert werden und ergeben sich unter anderem durch die Art der Komplexbildung, die durch „adaptive recognition“ erfolgen kann. Bei dieser Bindung können sich sowohl Konformationsänderungen am Aptamer als auch am Target ereignen. Nach der räumlichen Faltung um den Liganden (adaptive folding) erhalten die Aptamere eine stabile und definierte Konformation (Famulok und Mayer, 2005; Hermann und Patel, 2000).

Im Allgemeinen bilden ein oder zwei Struktur motive die Basis eines Aptamers. Vorwiegend formen Aptamere verschiedene Haarnadelschleifen-Strukturen (hairpins), Pseudoknoten und Quadruplex-Strukturen (Kulbachinsky, 2007). Die wichtigsten Interaktionen, die bei der Assoziation mit dem Epitop des Target-Moleküls auftreten, sind neben Passgenauigkeit (molecular shape complementarity), Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen sowie Stapelwechselwirkungen (stacking interactions), die sich zwischen den planaren Basen der Nukleotide ausbilden (Hermann und Patel, 2000). Aptamere tendieren dazu, die biologische Funktionen ihrer Zielmoleküle zu verändern. In den meisten Fällen inhibieren Aptamere die Aktivität des Target-Moleküls. Nur wenige der bisher identifizierten Aptamere zeichnen sich durch eine stimulierende Wirkung aus (Kulbachinsky, 2007).

Die Fähigkeit von Aptameren zur Target-Bindung und Target-Inhibierung konnte sowohl in vitro und in Zellkulturen als auch im lebenden Tiermodell aufgezeigt werden (Mayer und Jenne, 2004).

2.5.2. Vorteile von Aptameren im Hinblick auf ihre Anwendung

Die Fähigkeiten, ein Zielmolekül zu binden und zu inaktivieren, lässt vielfach den Vergleich von Aptameren mit Antikörpern zu. Die Bindung an ein Target erfolgt bei beiden Molekülklassen mit ähnlicher Affinität und Selektivität. Aptamere werden durch chemische Synthese vollständig in vitro hergestellt, die klassische Produktion von Antikörpern findet hingegen in Tieren oder tierischen Zellkulturen statt. Aptamere können aufgrund der in-vitro-Synthese auch gegen toxische und nicht-immunogene Target-Moleküle selektiert werden. Das Herstellungsverfahren von Aptameren gewährleistet die Produktion von hochreinen Oligonukleotiden, die eine gleichbleibende Aktivität aufweisen. Chargenabhängige Qualitätsschwankungen, denen Antikörpern unterliegen, treten bei Aptameren nicht auf. Auch liegen bisher keine Hinweise dafür vor, dass Aptamere immunogen sind (Luzi et al., 2003; Nimjee et al., 2005a).

Ein Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern besteht darin, dass ihre Herstellung nicht unter physiologischen Bedingungen erfolgen muss. Die Selektionsbedingungen (zum Beispiel niedriger pH-Wert, Lösungsmittel, Temperatur) können den vorherrschenden Gegebenheiten des Anwendungsbereiches angepasst werden (Mairal et al., 2008). Aptamere besitzen eine große Stabilität gegenüber hohen Temperaturen. Denaturierungen sind reversibel. Bereits innerhalb weniger Minuten können Aptamere wieder ihre aktive Konformation annehmen. Auch Wiederverwendungen von Aptameren und Lagerungen für eine längere Zeitdauer sind möglich. Antikörper sind hitzeempfindlich und denaturieren bei zu hohen Temperaturen irreversibel (Jayasene, 1999).

Aufgrund der chemischen Herstellungsmethode ist es möglich, Aptamere gezielt zu modifizieren. Neben Modifizierungen, die der Erhöhung von Affinität, Spezifität und Stabilität dienen, können Aptamere auch mit verschiedenen Funktionen ausgerüstet werden. Beispielsweise können während der Synthese Reportermoleküle wie fluoreszierende Gruppen oder Affinitätsmarker eingebracht werden (Mayer und Jenne, 2004).

Wegen der Empfindlichkeiten gegenüber Nukleasen, müssen besonders bei einer in-vivo-Applikation von RNA-Aptameren nukleaseresistente Modifikationen an den zur Synthese verwendeten Nukleotiden eingeführt werden. Die In-vitro-Halbwertszeit von unmodifizierten RNA-Oligonukleotiden in Plasma beträgt nur wenige Sekunden, bei der DNA liegt sie im Bereich von 30-60 Minuten (White et al., 2001). Häufig durchgeführt werden stabilisierende Modifikationen an 2'-Positionen. Beispielsweise durch Einbau einer 2'-Fluoro- oder 2'-Aminogruppe an der 2'-Position der Ribose (Eaton und Pieken, 1995; Famulok et al.; 2000). Zum Schutz vor Exonukleasen können an den 5' und 3'-Enden der Aptamere Schutzgruppen (Cap-Strukturen) angehängt werden (Pendergrast et al., 2005). Die Verlängerung der Halbwertszeit von RNA-Aptameren kann auch durch die Applikation von „Spiegelmeren“ verlängert werden. Anstatt den natürlich vorkommenden rechtsdrehenden (D = dexter, rechts) D-RNA's oder D-DNA's werden die L-konfigurierten (L = laevus, links) Enantiomere eingesetzt (Breaker, 2004, Kulbachinsky, 2007). Diese spiegelbildlichen L-RNA's werden nicht durch Nukleasen abgebaut, da sie diese nicht als Substrat erkennen. Durch Konjugation mit Polyethylenglykol oder anderen Molekülen mit einem hohen Molekulargewicht (high-molecular-weight molecules) wird eine zu schnelle renale Filtration und Exkretion der kleinen Aptamer-Moleküle verhindert (White et al., 2000; Zhang et al., 2004).

Eine weitere positive Eigenschaft der Aptamere besteht darin, dass ihre Aktivität durch ein aptamerspezifisches Antidot reguliert werden kann. Die Möglichkeit, die Wirkung eines Aptamers zu regulieren, ist von wesentlichem Interesse bei einer therapeutischen Anwendung von Aptameren. Es handelt sich bei diesen Aptamer-Gegenmitteln um Antisense-Moleküle, die an Aptamere durch komplementäre Basenpaarung binden. Die Wirkung eines Aptamers kann dadurch unverzüglich aufgehoben werden (Mayer und Famulok, 2007; Rusconi et al., 2002).

2.5.3. Einsatzgebiete von Aptameren

Hohe Affinität und Spezifität ermöglichen vielfältige Einsatzmöglichkeiten von Aptameren. Sie finden Einsatz als molekulare Werkzeuge in der Grundlagenforschung von Biomolekülen (Target-Validierung) sowie in der Diagnostik, Arzneimittelforschung und Therapie.

2.5.3.1. Target-Validierung

Aufgrund der Fähigkeit, die Funktionen von Proteinen zu inhibieren, sind Aptamere auch zur Validierung von Target-Molekülen geeignet. Die Target-Validierung umfasst die Aufklärung von Protein-Funktionen, die Identifizierung von Proteinen als mutmaßliche Verursacher von Krankheiten sowie deren Zugänglichkeit/Empfänglichkeit für therapeutische Eingriffe. Eine Vorgehensweise auf dem Gebiet der Target-Validierung besteht darin, den Funktionsverlust eines Proteins durch genetische Inaktivierung auf Genom – oder Transkriptionsebene zu erreichen (Proske et al., 2005). Als Alternative hierzu bieten Aptamere einige Vorteile. Einer der wesentlichen Vorteile ist, dass Aptamere nicht das Gen, sondern das Protein ausschalten und das Auftreten von pleiotropen Effekten umgangen werden kann. Die Analyse von Target-Molekülen mit Hilfe von Antikörper und Peptiden aus Phagendisplaybibliotheken erfolgt ebenso wie bei der Anwendung von Aptameren durch direkte Wirkung auf das Zielprotein. Nachteilig an diesen Technologien ist unter anderem die geringe Spezifität, die die Peptide aus Phagendisplaybibliotheken aufweisen. Antikörper sind nur schwer gegen Zielmoleküle im Zellinneren einsetzbar. Sogenannte Intramere ermöglichen, dank der Entwicklung von geeigneten Intramer-Expressions-Systemen, auch die Selektion von Aptameren gegen intrazelluläre Target-Proteine und die Analyse von Proteinen im Inneren von Zellen (Mayer und Jenne, 2004).

2.5.3.2. Diagnostik

Aptamere eignen sich als Detektionsreagenzien in vielen Sparten der klinischen Diagnostik. Hierbei bieten Aptamere eine interessante Perspektive zu den häufig benutzten Antikörpern. Beispielsweise konnte anhand von Aptameren in einem sogenannten proximity-ligations assay der Nachweis einer zeptomolaren Konzentration eines Proteins gezeigt werden. Das stellt eine 1000-fache Sensitivitätszunahme im Vergleich zum konventionellen ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) dar (Proske et al., 2005). Potenzielle Anwendung können Aptamere unter anderem auch bei Western blots, Microarrays, in vivo Imaging und Immunoprecipitation finden. Bereits früh setzten Drolet et al. (1996) Aptamere in einem ELISA-ähnlichen Format, dem Enzyme-linked oligonucleotid assay, ein (Mayer und Jenne, 2004). Der Enzyme-linked oligonucleotid assay verwendete Aptamere gegen den Angiogenesefaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Faktor) und erwies sich als wirksam zur Konzentrationsmessung des Zielproteins in einer biologischen Probe. Eine weitere

Möglichkeit zur Detektion von Target-Molekülen sind sogenannte Aptamer beacons, die die Erkennung eines Zielmoleküls direkt in ein optisches Signal umwandeln. Hierzu besitzen Aptamer beacons ein eingebautes Fluorophor, von dem bei struktureller Veränderung des Aptamers bei der Target-Bindung ein fluoreszierendes Signal ausgeht. Hamaguchi et al. (2001) generierten ein solches Anti-Thrombin-Aptamer, bei dem in Abwesenheit des Zielmoleküls die fluorophore Gruppe durch einen als „Quencher“ (Fluoreszenz-Löcher) fungierenden komplementären Nukleotid unterdrückt wird (Proske et al., 2005). Die durch die Bindung des Thrombins induzierte Strukturänderung führt zur Entlassung des Quenchers und zur Ausbildung eines Fluoreszenzsignals. Aptamere wurden auch erfolgreich als Detektionsreagenz im Bereich von bioanalytischen Testsystemen getestet. Liss et al. (2002) setzten Aptamere im Quarzkristall Biosensor ein. Die Studie arbeitete mit DNA-Aptameren für humanes Immunglobulin E und zeigte, dass Aptamere in Bezug auf Spezifität und Sensitivität equivalent zu Antikörpern sind. Ein relevanter Vorteil besteht darin, dass Aptamere mit 5-25 kDa relativ kleine Moleküle sind. Aufgrund dessen können sich Aptamere zur Verbindung mit Oberflächen in einer größeren Dichte anordnen und eine hohe Wirksamkeit des Detektionsbereich erreichen (Mayer und Jenne, 2004).

Anwendung finden Aptamere ebenfalls als molekulare Erkennungswerkzeuge in der analytischen Chemie. In diesem Bereich sind Aptamere vorzugsweise als immobilisierte Liganden in Separationstechnologie wie Affinitätskapillarelektrophorese und der Kapillarelektrochromatographie verwendet worden (Luzi et al., 2003).

Aptamere sind auch interessant als histologischer Tumormarker. Blank et al. (2001) generierten Fluoreszein-konjugierte Aptamere zur Diagnose eines Glioblastoms des Gehirns (Proske et al., 2005).

An ihr Target gebundene Aptazyme besitzen katalytische Aktivität. Aptazyme sind zusammengesetzt aus katalytisch aktiven Ribozymen (RNA-Moleküle) oder Desoxyribozymen (DNA-Moleküle) und einem Aptamer. Die Wirkung der Aptazyme erfolgt über allosterische Enzymaktivität (allosterische Ribozyme bzw. Desoxyribozyme). Hierbei erfolgt die Modulation der katalytischen Aktivität durch die Bindung eines Effektors an die Rezeptor-Domäne (Aptamer), wodurch eine Strukturänderung induziert wird. Diese führt zur Auslösung der katalytischen Reaktion durch die katalytische Domäne (Ribozym oder Desoxyribozym) (Breaker, 2004; Luzi et al., 2003). Aptazyme können auch zur Target-Detektion benutzt werden. Beispielsweise kann durch den Einbau eines Fluorophors und eines Fluoreszenz-löschenden Moleküls (Fluoreszenz-Quencher) in die katalytische Domäne die Bindung eines Target-Moleküls durch eine Änderung des Fluoreszenzsignals ermittelt werden (Famulok und Mayer, 2005).

2.5.3.3. Therapie

Aptamere sind als Therapeutika auf den Gebieten der Anti-Infektiva, Antikoagulantien, Anti-Inflammatorika, zur Immuntherapie, Antiangiogenese und Antiproliferation überprüft worden (Proske et al., 2005).

Als bisher einziges Medikament auf der Basis von Aptameren wurde 2004 Macugen (Pegaptanib sodium, Pfizer und Eyetech) zugelassen (Proske et al., 2005). Macugen kann zur Behandlung der altersbedingten Maculadegeneration eingesetzt werden. Grundlage des Medikaments ist ein RNA-Aptamer gegen VEGF-165. Die Isoform VEGF-165 des Wachstumsfaktors ist primär verantwortlich für die durch Neovaskularisierung entstehenden pathologischen Veränderungen am Auge (Ng et al., 2006). Ein therapeutisches Anti-von Willebrand Faktor-Aptamer (ARC1779) konnte erfolgreich in gesunden Probanden getestet werden. Das Aptamer weist eine dosis- und konzentrationsabhängige Inhibierung der vWF-Aktivität und seiner Thrombozyten-Funktionen auf. ARC1779 bindet an die A1-Domäne von vWF, inhibiert dessen Interaktion mit dem Glykoprotein Ib-Rezeptor auf Thrombozyten und wird als potentiell Agens zur Verhinderung von pathologischen Thrombosen betrachtet. Angestrebt wird der Einsatz von ARC1779 beim akuten Koronarsyndrom (Gilbert et al., 2007).

Weitere antikoagulatorisch wirkende Aptamere sind selektiert worden von Rusconi et al. (2000; 2002) gegen FIXa und FVIIa. Auch Aptamere gegen Thrombin konnten entwickelt werden (Bock et al., 1992; Heckel et al., 2006; Müller et al., 2007).

Auf dem Gebiet der therapeutischen Anwendung sind Aptamere nicht nur interessant als Medikament, sondern auch als zellspezifisches Transportmedium, um Wirkstoffe in Zielzellen zu bringen. Als Beispiel sei hier ein Nanopartikel-Aptamer-Biokonjugat von Farokhzad et al. (2004) genannt, welches aus Nanopartikeln mit eingeschlossenen Wirkstoffen und einem RNA-PSMA (Prostata-spezifischen Membranantigen)- Aptamer besteht und somit Prostata-Krebszellen anzielt.

2.5.4. SELEX

SELEX ist eine chemische Methode zur Selektion von spezifisch bindenden Nukleinsäuren-Aptameren. Angereichert werden die gesuchten Moleküle durch einen zyklischen Prozess von Selektion und Amplifikation. Ausgangspunkt des Verfahrens ist eine kombinatorische Zufallsbibliothek aus einzelsträngigen Nukleinsäuren. Die Hauptschritte des SELEX-Prozesses sind (i) Inkubation einer Oligonukleotid-Bibliothek (DNA-, RNA- oder modifizierte Nukleinsäuren) mit dem Target-Molekül, (ii) Separierung der Oligonukleotid-Target-Komplexe von nicht gebundener Nukleinsäure, (iii) Amplifizierung der gebundenen Oligonukleotide durch Polymerase Chain Reaction (PCR). Die hier aufgeführte Methode entspricht dem generellen Schema des SELEX-Prozesses zur Generierung von Aptameren. Basierend auf diesem Prinzip existieren verschiedene Modifikationen des SELEX-Verfahrens (Kulbachinskiy, 2007).

2.5.4.1. SELEX-Prozess zur Gewinnung von DNA-Aptameren

Als erster Schritt des Prozesses wird als Startpool durch kombinatorische Synthese eine Bibliothek aus einzelsträngigen ssDNA-Oligonukleotiden erzeugt. Jedes Oligonukleotid besteht aus einer randomisierten Kernregion, in der die 4 Nucleobasen zu einer zufälligen Basenabfolge statistisch verteilt sind. Dieser Bereich variabler Sequenzabfolge hat typischerweise 40 Nucleotide. Theoretisch könnte die Start-Bibliothek aus 10^{24} ($4^{40} = 1,2 \times 10^{24}$) unterschiedlicher Molekülen bestehen. Die Menge an primär eingesetzten individuellen Oligonukleotid-Sequenzen im Pool liegt in der Regel bei 10^{14} - 10^{15} Molekülen. Diese Anzahl ist sehr hoch und gestattet mit großer Wahrscheinlichkeit die Selektion eines Aptamers, das spezifisch an das gewünschte Target bindet. Der zentrale Abschnitt wird von zwei flankierenden 5`-und 3`-Regionen, die bekannter und konstanter Sequenz sind, umgeben. Diese flankierenden Regionen sind Primer-Bindungsstellen für die Amplifizierung durch PCR (Luzi et al., 2003). Zur Selektion derjenigen Oligonukleotide, die affin für das Target sind, wird die Oligonukleotid-Bibliothek mit den Zielmolekülen inkubiert. Im nächsten Schritt des SELEX-Prozesses werden die affinen Target-gebundenen Oligonukleotiden von den nicht-affinen ungebundenen Nucleinsäuren separiert. Zur Trennung der funktionellen Nucleinsäuren werden verschiedene Separationstechniken angewendet. Bei Selektion gegen kleinere Zielmoleküle oder Proteine werden die Targets im Allgemeinen auf einer festen Matrix aus Affinitätsorptionsmittel oder magnetischen Beads immobilisiert. Angewendet werden auch Filtrationen (z.B. Nitrozellulosefilter) und Zentrifugation (Kulbachinskiy, 2007). Damit die Selektion von denjenigen Nucleinsäuren verhindert wird, die an die Absorptionsmittel binden, können die Oligonukleotid-Bibliotheken vor (jeder) Selektionsrunde mit dem Sorptionsmittel inkubiert werden. Die Zielmoleküle sind während dieses Vorgangs nicht anwesend. Sequenzen, die an das Sorbent binden, können anhand einer solchen Gegenselektion von der Aptamer-Selektion ausgeschlossen werden. Auch die Anwendung von verschiedenen Selektionsmethoden verhindert die Selektion von Nucleinsäuresequenzen, die mit dem Sorbent interagieren. Außerdem kann dieses Vorgehen die Effektivität der Selektion steigern (Kulbachinskiy, 2007). Im Anschluss an verschiedene Waschstschritte werden die gebunden Nucleinsäuren von den Zielmolekülen separiert. Nach Hinzufügen von Primeren zu den selektierten DNA-Sequenzen werden die Aptamere mittels PCR amplifiziert. Die so angereicherten doppelsträngigen (ds, double-stranded) DNA-Moleküle (dsDNA) bilden nach Strangseparierung die Bibliothek für die nächste Selektionsrunde und es schließt sich ein zyklischer Prozess von Selektion und Amplifikation, durch den die affinen Aptamere exponentiell angereichert werden, an. Die Anzahl von Aptameren mit niedriger Bindungsaffinität werden mit jedem Zyklus weiter reduziert. Am Schluss verbleiben die Aptamere, die die höchsten Bindungsaffinitäten besitzen und deren Affinität nicht mehr gesteigert werden kann. Im Durchschnitt sind diese Aptamere nach 5 bis 15 Selektionsrunden gefunden (Kulbachinskiy, 2007). Beurteilt werden kann dieser Entwicklungsprozess anhand von Oberflächen-Plasmon-Resonanz, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie oder radioaktiven Bindungs-Assay (Mairal et al., 2008). Die amplifizierten Nucleinsäuren aus der letzten Selektionsrunde werden kloniert und sequenziert. Anschließend

werden die individuellen Sequenzen auf ihre Bindungsfähigkeiten hin untersucht. Die Klone mit der besten Affinität werden ausgewählt und in ausreichender Menge produziert.

Zum weiteren Vorgehen gehören die Analyse von möglichen Bindungsmotiven der Primär- und Sekundärstruktur und postselektive Optimierungsschritte, zu denen auch die Verkürzung der Aptamer-Sequenzen gehören (Mairal et al., 2008).

Entfernt werden können Nukleinsäure-Abschnitte, die für die Faltung der dreidimensionalen Struktur nicht von Bedeutung sind.

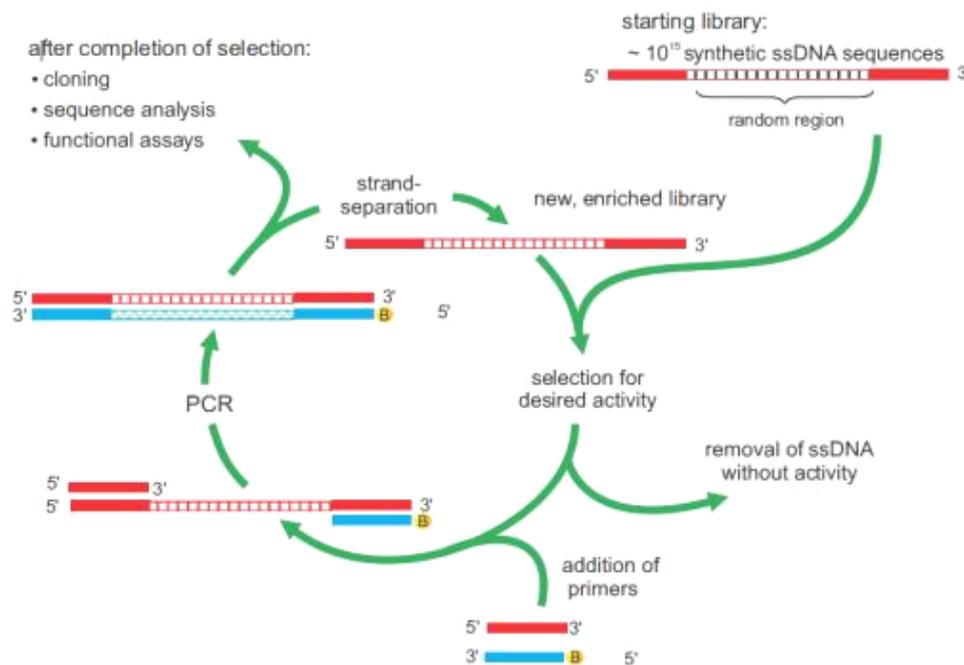


Abb. 3 : Schema des SELEX-Prozesses zur Generierung von DNA-Aptameren (aus Zhang et al., 2004).

2.5.4.2. SELEX-Prozess zur Gewinnung von RNA-Aptameren

Die Produktion von RNA-Aptameren erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die DNA-SELEX-Methode. Einige Herstellungsschritte verlaufen allerdings abweichend.

Bei der Generierung von RNA-Aptameren dient eine ssDNA-Startbibliothek zunächst als Vorlage zur Erstellung einer RNA-Bibliothek. In die DNA-Bibliothek wird in die 5`terminale Primer-Bindungssequenz ein T7-Promotor als Erkennungregion für die T7-RNA-Polymerase eingeführt (Kulbachinskiy, 2007). Durch Polymerase-Reaktion werden die ssDNA-Oligonukleotide zu dsDNA ergänzt, welche als Transkriptionsvorlage für die T7-RNA-Polymerase dienen. Die im Anschluss an den Transkriptionsvorgang vorliegenden RNA-Oligonukleotide bilden die RNA-Bibliothek, aus der entsprechend dem DNA-SELEX-

Prozess, RNA-Aptamere gewonnen werden können. Nach Inkubation des RNA-Pools mit dem Zielmolekül müssen die selektierten RNA-Nukleinsäuren jedoch mittels reverser Transkription in DNA (complementary DNA) umgeschrieben werden, damit ihre Amplifizierung anhand von PCR stattfinden kann. Die durch PCR produzierte dsDNA wird durch T7-Polymerase wieder in RNA umgeschrieben.

2.6. Selektion von DNA-Aptameren gegen APC

2.6.1. SELEX-Prozess

Als APC-Quelle zur Selektion von DNA-Aptameren gegen APC wurde Drotrecogin Alpha (Xigris®) verwendet. Drotrecogin Alpha ist ein rekombinant hergestelltes und mit Thrombin aktiviertes Protein C Präparat, welches als Medikament bei schwerer Sepsis eingesetzt wird. Die Verwendung des Medikaments stellte die direkte Verfügbarkeit hochgereinigter Ziel-Proteine sicher. Für den Selektionsvorgang wurden die APC-Moleküle immobilisiert. Hierzu wurden 100 µg des APC biotinyliert und an Streptavidin-beschichtete, magnetische Beads gekoppelt.

Der durchgeführte SELEX-Prozess entspricht dem in Kapitel 2.5.4.1. beschriebenen und graphisch dargestellten Ablauf. Die Startbibliothek, der sogenannte D1-Pool, setzte sich aus der 49-Basen-langen variablen Sequenzregion: 5'GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-N49-CATGCTTATTCTTGTCTCCC-3' (A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, T-Thymin) zusammen, die von zwei Primerbindungsstellen flankiert wurde.

Initial wurden 500 pmol (3×10^{14} Moleküle) des D1-Pools mit 8 µg immobilisiertem APC in Selektionspuffer inkubiert. Die Beads wurden nach der Inkubation gewaschen und gebundene DNA bei 80 °C in 100 µl Aqua destillata eluiert. Mittels PCR wurde der evolutionierte Pool anschließend amplifiziert.

Nach Trennung der doppelsträngigen Nukleinsäuren in Einzelstränge wurden 50 pmol der selektierten Aptamere in den nächsten Selektionszyklus eingesetzt.

Ab der dritten Selektionsrunde wurden zum einen eine Gegenselektionen (Counter-SELEX) gegen die verwendeten Streptavidin-Beads durchgeführt und zum anderen die Anzahl der Waschschrte nach Bindung der Aptamere an das immobilisierte APC schrittweise erhöht. Die Gegenselektion der ssDNA-Bibliothek gegen nicht mit Aptameren beladene Streptavidin-Beads bezweckt hierbei die Entfernung derjenigen Nukleinsäuren, die an Streptavidin oder die Bead-Strukturen binden.

2.6.2. Bindungseigenschaften und Klonierung des selektierten D1-Pools

Anschließend wurden die APC-Bindungseigenschaften der aus dem D1-Pool evolutionierten DNA-Aptamere analysiert. Hierzu wurden die nach den Runden 1, 8, 10 und 12 selektierten Aptamere mittels einer Polynukleotid-Kinase am 5'-Ende mit radioaktivem Phosphor mittels

32 p-Adenosintriphosphat markiert. Die so radioaktiv-markierten Aptamer-Pools wurden in Selektionspuffer in einer Konzentration von 0,4 nM mit verschiedenen Konzentrationen an APC für 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden jeweils 20 µl der Ansätze mittels eines Vakuumsystems über eine Nitrozellulose-Membran filtriert. Anschließend erfolgten mehrere Waschrunde um überschüssige, nicht proteingebundene Radioaktivität von der Membran zu entfernen. Die Aufnahme der jeweiligen Strahlungsintensitäten erfolgte mittels eines Phosphor-Screens. Ausgewertet wurden die Daten mittels FUJIFILM FLA-3000 mit entsprechender AIDA Imagequant Software. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt (Müller et al., unpublished results).

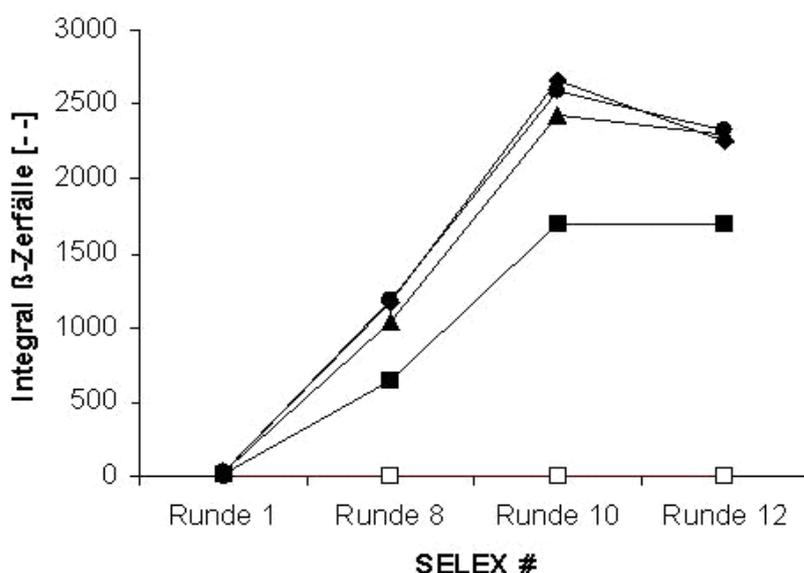


Abb. 4: Darstellung der Bindung des selektierten D1-Pools nach den Selektionsrunden (#) 1, 8, 10 und 12 an APC (□ - kein APC, ■ - 1 nM APC, ▲ - 10 nM APC, ◆ - 100 nM APC, ● - 1000 nM APC) anhand der Strahlungsintensität [- -].

Aufgrund des ermittelten Bindungsverhaltens wurde zur weitergehenden Untersuchung und Charakterisierung der nach dem zehnten Selektionszyklus erhaltene Pool kloniert und die Inserts der Vektoren vereinzelter Koloniebildende Einheiten sequenziert.

In Abbildung 5 ist ein Sequenz-Alignment der verschiedenen erhaltenen Monoklone (HS01, HS02, HS03, HS04, HS06, HS08) dargestellt, welches eine 14-Basen lange Konsensussequenz innerhalb der Sequenzen der verschiedenen Aptamere erkennen lässt.

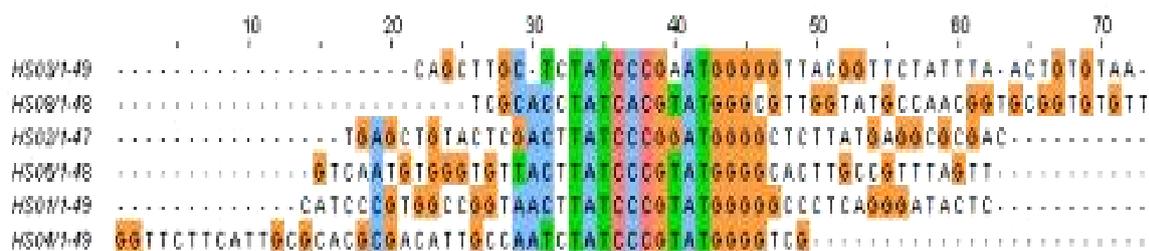


Abb. 5: Konsensus-Sequenz der untersuchten Aptamer-Klone aus Selektionszyklus 10. Das dargestellte Alignment wurde mittels des ClustalW-Interfaces auf der EMBI-EBI homepage ([http://www. Ebi.ac.uk/clustalW](http://www.Ebi.ac.uk/clustalW)) erstellt.

2.6.3. Herstellung der Aptamere HSO2, HSO3, HSO4 und HSO8

Zur Herstellung der Aptamere HSO2, HSO3, HSO4 und HSO8 wurden die entsprechenden Nukleinsäure-Sequenzen von der Arbeitsgruppe zuerst durch PCR-Amplifikation vermehrt. Als Ausgangsmaterial dienten dabei aus Bakterienkulturen isolierte Plasmide mit entsprechendem Insert. Anschließend war es durch Verwendung eines 5'-biotinylierten Reverse-Primers möglich, die PCR-Produkte an Streptavidin-beschichtete, magnetische Beads zu koppeln. Die Einzelstrangtrennung der PCR-Produkte fand unter basischen Bedingungen statt. Anschließend wurden die Sense-Stränge (Aptamer-Sequenzen) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert durch Zugabe von HCl neutralisiert.

Für die anschließende Quantifizierung der Aptamere durch photometrische Messung wurden die Aptamere nach einer Acetat-Fällung in Reinstwasser aufgenommen.

2.6.4. Bindungseigenschaften der monoklonalen Aptamersequenzen

Für die Ermittlung der Bindungseigenschaften der vier Monoklone wurden die entsprechenden Aptamere HSO2, HSO3, HSO4 und HSO8 an ihrem 5'-Ende mit ^{32}p -ATP markiert. Die Dissoziationskonstanten wurden anhand des unter Punkt 2.6.2. beschriebenen Filterbindungsexperiment unter Einsatz verschiedener APC-Konzentrationen berechnet. Abbildung 6 (Müller et al., unpublished results) zeigt die ermittelten Bindungseigenschaften und die aus den Kurvenverläufen berechneten K_d -Werte.

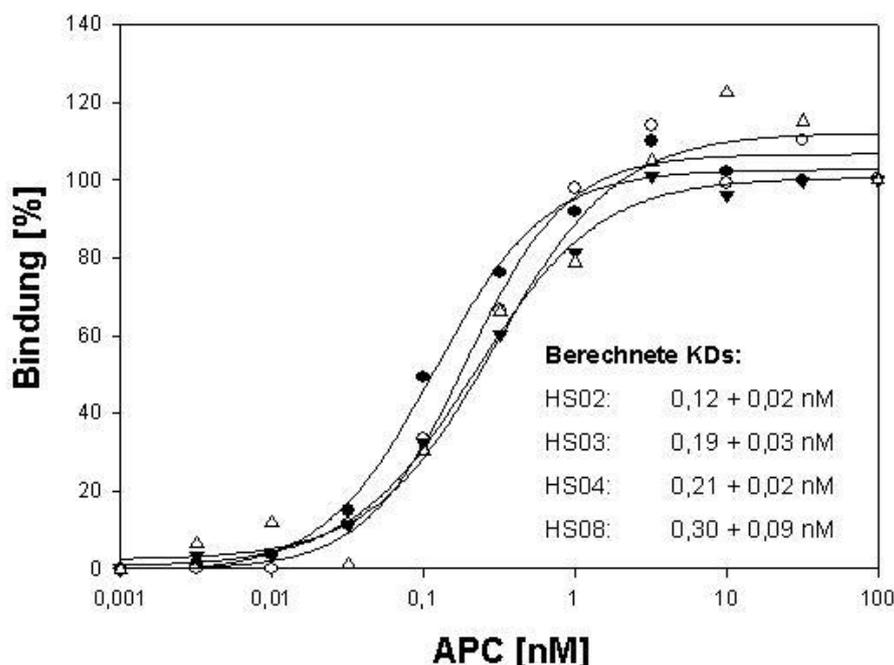


Abb. 6: Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Aptamere aus den vier Monoklonen HS02, HS03, HS04 und HS08 betreffend ihrer Bindung an APC. Die Aptamere wurden radioaktiv-markiert und in Selektionspuffer in einer Konzentration von 0,4 nM mit den in der Graphik aufgeführten APC-Konzentrationen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Berechnung der entsprechenden K_d-Werte wurden dargestellten Datenpunkte (relative Bindung über APC-Konzentration) anhand einer 4-Parameter-Logistik-Funktion interpoliert. Angewendet wurde hierfür die Software SigmaPlot 9.0.

Die Abbildung 6 zeigt, dass alle vier überprüften Aptamere eine hohe Affinität zu APC haben und Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich besitzen. Das Aptamer HS02 wies hierbei die besten Bindungseigenschaften auf.

2.6.5. Spezifität der monoklonalen Aptamersequenzen

Die Spezifität der entwickelten Aptamere wurde durch die Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen von Protein C, Thrombin, FVIIa, FXa und FIXa mit den radioaktiv-markierten Aptamere und anschließendem Filterbindungsexperiment ermittelt.

Für Thrombin, Faktor VIIa, Faktor Xa und Faktor IXa wurde bis zu einer Konzentration von 320 nM keine Bindung der Aptamere beobachtet. Festgestellt wurde hingegen die Bindung aller Aptamere an das Zymogen Protein C. Allerdings lag die ermittelte K_d in allen Fällen um mindestens 2 Zehnerpotenzen über den für APC ermittelten Werten (Müller et al., 2009).

2.6.6. Sekundärstruktur-Analyse, Herstellung und Aufreinigung der HS02-Varianten

Zur Herstellung von HS02-Varianten wurde von der Arbeitsgruppe die Ausgangssequenz des Aptamers bearbeitet. Hierfür wurde zum einen die Nukleinsäuresequenz stückweise am 5'- bzw. 3'-Ende verkürzt. Teilweise wurden die DNA-Moleküle auch intramolekular modifiziert.

Die Herstellung der konstruierten HS02-Varianten führte die Firma Operon aus, die die Aptamere anhand von Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie aufreignete und lyophilisiert aushändigte.

Nach Zustellung wurde die Integrität der Aptamere überprüft und diese bei Bedarf weiter aufgereinigt. Hierzu wurden die Aptamere zu 100 µM in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst und jeweils 3 nmol (30 µl) dieser Lösung in einem 10%-igen, denaturierten Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Gel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach der Elektrophorese mittels UV-Shadowing indentifiziert und die entsprechenden Bereiche aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Isolierung der Oligonukleotide aus den Gel-Stückchen wurden diese jeweils in eine 2 ml Einwegspritze überführt und mittels des Kolbens durch den Auslass der Spritze in 500 µl 0,3 M Natriumacetat (pH 5,4) gequetscht. Dieser Ansatz wurde für 90 Minuten bei 65 °C in einem Thermoschüttler inkubiert und die Gel-Reste anschließend durch Abpressen durch eine mit Glaswolle gefüllte 2 ml Einwegspritze entfernt. Zur Aufreinigung und Konzentrierung der Aptamere wurden die Ansätze einer Natriumacetat-Fällung unterzogen und die entstandenen Pellets nach einem Waschschrift mit 70%-Ethanol in 30 µl Reinstwasser aufgenommen und wie unter Punkt 2.6.3. beschrieben quantifiziert.

Über das Programm mfold erfolgte die Berechnung der Sekundärstrukturen der unterschiedlichen HS02-Aptamer-Varianten (siehe Abb. 7).

Die ermittelten Sekundärstrukturen der einzelnen DNA-Moleküle in Abbildung 7 zeigen aus Stamm und Schleife bestehende Stem-Loop-Strukturen (Haarnadelstruktur). Die 88 Basen umfassende Ausgangssequenz HS02-88 weist im Basisstamm einen CT-wobble sowie einen CT-Basenüberhang auf. In dem CT-wobble liegt eine Basenpaarung zwischen den beiden Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin vor. Dieses Basenpaar weicht von den üblichen von Watson und Crick beschriebenen Paarungen ab, wonach aus sterischen Gründen eine Purin-Base (Adenin und Guanin) mit einer Pyrimidinbase (Thymin und Cytosin) paart.

Neben den Längen Kürzungen wurden als zusätzliche Molekül-Modifikationen bei HS02-52G, -48G, -44G ein T-Nukleotid gegen ein G-Nukleotid ausgetauscht. Dadurch wurde der CT-Wobble entfernt. An Aptamer HS02-44G-CT erfolgte zusätzlich die Entfernung des CT-Basenüberhangs im Basisstamm. Dieser Überhang fehlt auch den Aptameren HS02-38 und HS02-36. In der Aptamer-Variante HS02-32 ist dieser Sequenzbereich infolge der verkürzten Moleküllänge nicht mehr vorhanden.

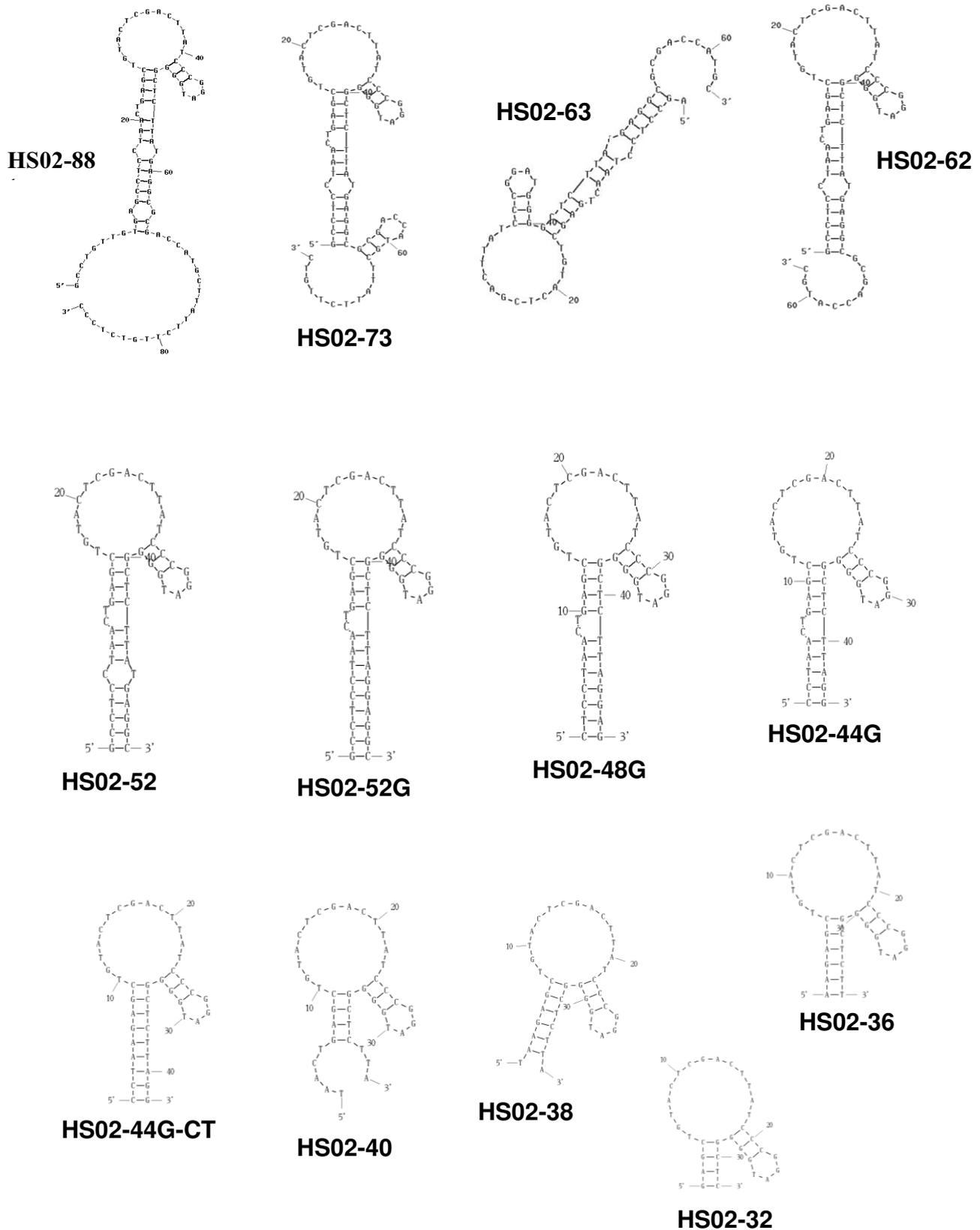


Abb. 7: Berechnete Sekundärstrukturen der HS02-Aptamer-Varianten. Die Benennung der einzelnen Aptamere entsprechen der Basenzahlen und den durchgeführten intramolekularen Modifikationen.

3. Material und Methoden

3. 1. Blutgerinnungsfaktor VIII-Präparate

In der Arbeit wurden zehn verschiedene für den therapeutischen Einsatz zugelassene humane FVIII-Konzentrate eingesetzt. Fünf der Präparate sind plasmabasierte FVIII-Konzentrate, fünf der Präparate sind rekombinant hergestellte FVIII-Konzentrate (s. Tabelle 1).

Tab.1: Übersicht der Blutgerinnungsfaktor VIII-Konzentrate

| plasmabasiert | rekombinant | Handelsname | Hersteller |
|----------------------|--------------------|---------------------|---|
| X | - | Beriate P | ZLB Behring Marburg GmbH, Marburg |
| X | - | Haemate HS | Dade Behring Marburg GmbH, Marburg |
| X | - | Haemoctin SDH | Biotest Pharma GmbH, Dreiech |
| X | - | Fanhdi | Instituto Grifols, S.A., Barcelona, Spanien |
| X | - | Octanate | Octapharma GmbH, Dessau |
| - | X | Advate | Baxter S.A., Lessiens, Belgien |
| - | X | Helixate Nex Gen | Bayer Biologicals S.r.l., Torri-Sovicille, Italien |
| - | X | Kogenate | Bayer Biologicals S.r.l., Torri-Sovicille, Italien |
| - | X | Refacto | Weyth Pharmaceuticals, Hants, Großbritannien |
| - | X | Recombinat | Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim |

3.2. Puffer

Zur Adjustierung der eingesetzten Reagenzien in die erforderlichen Konzentrationen wurden sechs verschiedene Arbeitspuffer eingesetzt (s.Tab. 2).

Tab. 2 Arbeitspuffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------|--|
| PBS | 13,7 mM Natriumchlorid 0,27 mM Kaliumchlorid 0,96 mM Dinatriumhydrogenphosphat 0,15 mM Kaliumhydrogenphosphat 1 mg/ml BSA pH 7,4 |
| HEPES-Puffer 1 | 130 mM HEPES 1 mg/ml BSA pH 7,4 |
| HEPES-Puffer 2 | 130 mM HEPES 36 mM Calciumchlorid 1 mg/ml BSA |
| HEPES-Puffer 3 | 130 mM HEPES 137 mM Natriumchlorid 1 mg/ml BSA 5 mM Calciumchlorid 10 µg/ml PL |
| TRIS | 20 mM TRIS 137 mM Natriumchlorid 1 mg/ml BSA 10 µg/ml PL 5 mM Calciumchlorid |
| Michaelispuffer | 175 ml Puffer-Stammlösung (58,86g Diethylbarbitursäure, 38,86g Natriumacetat, ad 2000ml H ₂ O) 175 ml Salzsäure 0,1 Mol 70 ml Natriumchlorid 0,9 % 455 ml H ₂ O |

PBS - phosphate buffered saline, BSA - Bovine Serum Albumin, HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure, PL-Phospholipide, TRIS - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, H₂O - Wasser

3. 3. Bestimmung der Aktivität in Faktor VIII-Präparaten

Versuchsprinzip

Von jedem der zehn humanen FVIII-Kräparate werden Proben mit 10 IU/ml in 1 ml Gesamtvolumen (in HEPES-Puffer 1) hergestellt und anschließend zu 1 IU/ml (mit HEPES-Puffer 1) verdünnt.

Von jedem dieser zehn Proben mit je 1 IU/ml FVIII werden die FVIII-Aktivitäten jeweils durch drei verschiedene Messmethoden bestimmt (Kapitel 3.1.1. und 3.1.2.).

3.3.1. Koagulometrische Gerinnungsteste

Die Koagulometrie ist eine Gerinnungsmessung, bei der die Fibrinbildungsgeschwindigkeit gemessen wird.

Die eingesetzten Koagulometer Amax CS 190 und KC 10 der Firma Amelung arbeiten nach dem Prinzip der Kugelmethode. Bei dieser Messmethode befindet sich die zu untersuchende Probe in einer um ihre Längsachse drehende schräggelagerten Messküvette, in der sich die dem Prinzip namensgebende Kugel befindet. Aufgrund der Schräglage des Gefäßes positioniert sich die Kugel der Schwerkraft folgend am tiefsten Punkt der Küvette. Die durch Auslösen der Gerinnungsreaktion gebildeten Fibrinfasern ziehen die Kugel von ihrer Position weg. Diese Lageänderung wird von einem magnetischen Sensor registriert und führt zum Stoppen eines zuvor gestarteten elektronischen Zeitmessers. Gemessen wird die Zeit vom Start der Gerinnungsreaktion bis zur Ausbildung eines so detektierbaren Fibringerinnsels.

Die koagulometrische Bestimmung der Aktivität in FVIII-Konzentraten erfolgt in dieser Dissertation durch einen Einstufen-Test, welcher auf der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) basiert. Die aPTT beurteilt die Funktion des intrinsischen Gerinnungssystems. Die Komponenten Phospholipide, Oberflächen-aktive Substanzen und Calcium-Ionen bewirken die Aktivierung von FXII und FXI. In der Arbeit wird die aPTT einer Mischung aus FVIII-Mangelplasma und Versuchsprobe gemessen. Dieses Mangelplasma weist alle Gerinnungsfaktoren außer dem zu untersuchenden FVIII auf. Die gemessene Gerinnungszeit ist dadurch nur von der Aktivität des zu messenden Gerinnungsfaktors der Versuchsprobe abhängig.

Die Aktivität des FVIII in Prozent der Norm wird über eine Bezugskurve ermittelt, die durch Verdünnung eines Standard-Human-Plasmas erstellt wird.

3.3.1.1. Messung mit immunadsorbiertem Faktor VIII-Mangelplasma

Durchführung

Die Messung der FVIII-Aktivität erfolgt mit immunadsorbiertem FVIII-Mangelplasma (Dade®, Behring).

Im Amax CS 190 wurden 10 µl jeder 1 IU/ml enthaltenen FVIII-Probe 1:5 mit 40 µl Michalis-puffer verdünnt und mit 50 µl immunadsorbiertem FVIII Mangelplasma gemischt. Anschließend folgt die Inkubation mit 50 µl Actin FSL für 180 Sekunden. Das verwendete Actin FSL enthält als gerinnungsauslösende Thromboplastine eine gereinigte Sojabohnen- und Kaninchenhirn-Phospholipid-Lösung sowie einen nicht näher beschriebenen Plasmaaktivator. Nach abgelaufener Inkubation werden 50 µl einer 20 mM Calciumchlorid-Lösung zur Gerinnungsfaktor-Aktivierung hinzugegeben.

3.3.1.2. Messung mit natürlichem Faktor VIII-Mangelplasma

Durchführung

Die Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgte hier mit natürlichem FVIII-Mangelplasma (Helena Laboratories) mittels einer Inhouse-Methode und Messung im Koagulometer KC 10.

Die beiden Versuchsbestandteile Serum und Lipoid wurden durch eigene Verfahren des Institutes hergestellt. Das eingesetzte Serum stammt von Blutspendern, das verwendete Lipoid wird aus Kaninchenhirn hergestellt und dient als Plättchenfaktor-3-Ersatz.

Zu Beginn des Testverfahrens wurden 200 µl der FVIII-Probe 1:1 mit 200 µl Michalispuﬀer verdünnt.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

- 100 µl natürliches FVIII Mangelplasma
- +100 µl Serum
- +100 µl der verdünnten Probe
- +50 µl Kaolin 2 % (w/v)
- +100 µl Lipoid
- Inkubation für 4 Minuten bei 37 °C
- +100 µl 0,3 M Calciumchlorid

3.3.2. Amidolytische Aktivitätstestung

Testverfahren zur amidolytischen Aktivitätsmessung von Enzymen basieren auf synthetischen Peptidsubstraten. Die Aminosäuresequenz der Peptide ist auf die Spaltspezifität des zu messenden Enzyms eingestellt. An das synthetische Substrat ist über eine Amidbindung eine chromogene oder fluorogene Indikatorgruppe gebunden. Die Abspaltung des Indikators durch das zu bestimmende Enzym verläuft parallel zu dessen proteolytischen Aktivität und kann durch photometrische bzw. fluorogene Messung festgestellt werden.

Zur Bestimmung der Aktivität der zehn FVIII-Präparate wurde das Testsystem FVIII-chromogen der Firma Dade Behring eingesetzt. Die Aktivität von FVIII wird mit diesem Messverfahren indirekt anhand seiner Kofaktor-Funktion im Tenase-Komplex bestimmt. Dabei basiert der zweistufige Test auf dem Prinzip, dass bei Überschuss an FX sowie bei optimal vorliegenden Konzentrationen von Calciumionen, Phospholipiden und FIXa, die Aktivierungsrate an FX direkt abhängig von der FVIII-Aktivität ist.

Im ersten Schritt des Assays wurde die Probe zu einem Gemisch aus bovinen FIXa, FX und Thrombin und anwesenden Phospholipiden gegeben. Die ausgelöste Aktivierung von FVIII ermöglicht dessen Beteiligung am Tenase-Komplex, der die FX-Aktivierung erreicht. Im zweiten Schritt dieses Testsystems wurde die FX-Aktivität durch Hydrolyse eines FXa-spezifischen Peptid-Substrates p-Nitroanilid bestimmt. Durch Spaltung dieses Substrates wird seine chromogene Gruppe p-Nitroanilin sowie dessen gelbe Farbe freigesetzt. Bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer wurde die zeitabhängige Zunahme der entsprechend ansteigenden Farbintensität gemessen. Die Menge an FXa und damit die Absorptionzunahme

korrelierte direkt mit der FVIII-Aktivität. Die erzielten Werte wurden automatisch durch Vergleich mit einer Standardkurve berechnet und werden als Prozent angegeben.

Durchführung

Jede Probe der FVIII-Präparate wurde 1:41 mit 0,9 % Natriumchlorid verdünnt.

Anschließend wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

0,1 ml der verdünnten Probe
+ 0,05 ml 0,7 pM bovines FX-Reagenz
+ 0,05 ml 0,2 pM bovines FIXa-Reagenz (beinhaltet 0,2 pM Thrombin)
Mischen
Inkubation für 50 Sekunden bei 37 °C

+ 0,15 ml FXa-Substratreagenz und Stopp-Puffer

Mischen der Reagenzien

Bis zu Beginn der Messung wurde 10 Sekunden gewartet.

Die Messung der Absorption pro Minute erfolgte für 15 Sekunden bei 405 nm im Gerät Electra 1400 C.

3.4. Wirkung von APC auf aktivierte Faktor VIII-Präparate

Versuchsprinzip

Die Wirkung von APC auf FVIIIa wurde anhand der Inkubation von FVIIIa mit einer seriellen APC-Verdünnungsreihe untersucht.

Die anschließende Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgte durch amidolytische Messung der FXa-generierten Umsetzung eines fluorogenen Peptidsubstrates (siehe Kapitel 3.3.2.) mittels eines aufgebauten FXa-Generierungs-Assays.

Das eingesetzte FX-Substrat der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz) zeichnet sich durch Markierung mit dem Fluorochrom AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) aus. Nach proteolytischer Spaltung durch FXa wird die Fluoreszenz der fluoreszierende Endgruppe bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm durch Absorptionänderung pro Zeit gemessen.

In dem verwendete Fluorometer Bio-Tek FLx 800 wurde diese kinetische Messung des Substratumsatzes für eine Messdauer von 20 Minuten durchgeführt. Pro Minute erfolgte eine Messung.

Die Faktor VIII-Aktivierungsreaktion durch Thrombin wurde mit Hilfe von synthetischem Hirudin (Refludan ®) gestoppt.

Zur Quantifizierung der verbleibenden FVIIIa-Restaktivität wurde in jedem Versuch parallel eine APC-freie FVIIIa-Verdünnungsreihe angefertigt. Die höchste FVIIIa-Konzentration

(100 %-Wert) der FVIIIa-Verdünnungsreihe entsprach der im Inaktivierungsversuch vorliegenden FVIIIa-Konzentration. Die FVIIIa-Verdünnungsreihe diente auch zur Überprüfung ob die Aktivierung des FVIII erfolgte.

Um die in dem Versuch erzielte Höhe der FVIII-Aktivität bewerten zu können, wurde in jedem der Versuche parallel eine FVIIIa-Verdünnungsreihe mitgeführt.

Probenvorbereitung

-Aktiviertes Protein C:

In serieller Verdünnung mit HEPES-Puffer 3 wurden sieben APC-Proben mit Konzentrationsstufen von 29 nM (1600 ng/ml) – 0,5 nM (25 ng/ml) hergestellt.

-FVIII:

Zur FVIII-Aktivierung wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

90 µl 10 IU/100 µl FVIII
+ 5 µl Thrombin (0,6 IU/ml bei rFVIII-Präparaten
2,4 IU/ml bei pbFVIII-Präparaten)

Inkubation für 1 Minute

+ 5 µl einer 287 nM Hirudin-Lösung

Anschließend wurden die FVIIIa-Proben mit HEPES-Puffer 3 zu 0,3 IU/100 µl verdünnt.

Für die FVIIIa-Verdünnungsreihe wurden von den 0,3 IU/ml FVIIIa durch serielle Verdünnung mit HEPES-Puffer 3 sechs serielle Verdünnungen von 0,16 IU/100 µl bis 0,005 IU/100 µl hergestellt.

Durchführung

Zur Inkubation der einzelnen FVIIIa-Proben mit jeweils einer der sieben APC-Proben wurden in jede Vertiefung einer weißen Mikrotiter-Platte pipettiert:

40µl der FVIIIa-Konzentrate (0,3 IU/100 µl)
+ 40 µl APC-Proben 1-7
Mischen durch Aufziehen in der Pipettenspitze
Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Negativkontrolle:

40 µl FVIIIa (0,3 U/100 µl)
+ 40 µl HEPES-Puffer 3
Mischen durch Aufziehen in der Pipettenspitze
Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Messansatz

25 µl FVIIIa-APC-Gemisch
bzw. Negativkontrolle bzw. FVIII-Standard

- + 25 µl 8,9 nM FIXa
- + 50 µl der 500 µM FX-Substratlösung
- + 50 µl 25 nM FX

3.5. Untersuchung des Einflusses eines APC-Aptamers auf aktiviertes Protein C

Die Untersuchung des Einflusses des Aptamers HS02 auf aktiviertes Protein C erfolgte über die Bestimmung von FVIIIa nach Inkubation mit Aptamer-gebundenem APC.

FVIIIa wurde anhand von Fluoreszenzmessung des FXa-vermittelten Substratumsatzes gemessen.

Die durchgeführte Untersuchungen lassen sich in folgende drei Versuchsbereiche gliedern:

- Aktivierung des verwendeten FVIII-Präparates Recombinate (Kapitel 3.5.1.)
- APC-induzierte Inaktivierung von FVIIIa (Kapitel 3.5.2.)
- Überprüfung der Inaktivierung von FVIIIa durch Aptamer-gebundenes APC mittels FXa-Generierungs-Assay (Kapitel 3.5.3.).

3.5.1. Aktivierung des verwendeten Faktor VIII-Konzentrates Recombinate

Versuchsaufbau und Durchführung:

Die durch Thrombin bewirkte Aktivierung des FVIII-Konzentrates Recombinate (Baxter) wurde anhand von zwei Versuchen untersucht und koagulometrisch über die Einstufen-Methode gemessen.

Im ersten Versuch wurde durch Inkubation des FVIII-Präparates mit seriell verdünnten Thrombin-Konzentrationen von 19 – 0,3 IU/ml der Einfluß der Thrombinkonzentration auf die Faktor VIII-Aktivität geprüft (Kapitel 3.5.1.1.).

- 90 µl FVIII (10 IU/ml)
- + 5 µl Thrombin (0,3-19 IU/ml)
- Inkubation für 1 Minute
- + 5µl Hirudin einer 287 nM Lösung

Der zweite Versuch untersuchte durch Inkubation von FVIII mit Thrombin für unterschiedliche Zeitdauern den Einfluss der Inkubationszeit auf die Aktivierung des FVIII-Präparates (Kapitel 3.5.1.2.).

- 947 µl FVIII (10 IU/ml, in PBS-Puffer)
- + 53 µl Thrombin (4,8 IU/ml)
- Entnahme von sechs 95 µl FVIIIa-Proben in einer Zeitspanne von 5 Minuten
- 95 µl FVIIIa
- + 5 µl Hirudin einer 287 nM Lösung

3.5.1.1. Untersuchung des Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Faktor VIII-Aktivierung

Probenvorbereitung

-Thrombin:

Mit HEPES-Puffer 2 werden von Thrombin Proben mit seriell steigenden Konzentrationen von 0,3 – 19 IU/ml gebildet.

-FVIII:

Mit PBS-Puffer wird eine FVIII-Probe mit 10 IU/ml in 1 ml Volumen hergestellt.

Durchführung

90 µl FVIII (10 IU/ml)

+ 5 µl Thrombin (1,2-19 IU/ml)

Inkubation für 1 Minute

+ 5 µl einer 287 nM Hirudin-Lösung

Verdünnung 1:10 zu 1 IU/ml

Von den 10 IU/ml Faktor VIII werden jeweils 90 µl entnommen und mit je 5 µl der Thrombin-Proben inkubiert.

Die Inkubation erfolgt für eine Minute bei Raumtemperatur und wird beendet durch die Zugabe von 5 µl einer 287 nM Hirudin-Lösung.

Für die Erstellung eines Kontrollwertes wird von jedem der beiden Faktor VIII-Präparate eine Probe ohne Thrombin verwendet. In dieser befinden sich 90 µl Faktor VIII (10 IU/ml), 5 µl PBS-Puffer und 5 µl der 287 nM Hirudin-Lösung.

Anschließend werden alle Proben mit PBS-Puffer 1:10 verdünnt und die Faktor VIII-Aktivität wird von jeweils 0,4 ml koagulometrisch im Amax CS 190 bestimmt (Messung im Amax erfolgt wie in 3.3.1.1.).

3.5.1.2. Kinetische Untersuchung der Faktor VIII-Aktivierung

Probenvorbereitung

-FVIII:

Von Recombinate wird ein Versuchsvolumen von 947 µl (10 IU/ml) in PBS-Puffer gebildet.

-Thrombin:

Mit HEPES-Puffer 2 werden 4,8 IU/ml Thrombin hergestellt.

Durchführung

947 µl FVIII (10 IU/ml, in PBS-Puffer)

+ 53 µl Thrombin (4,8 IU/ml)

Entnahme von sechs 95 µl FVIIIa-Proben in einer Zeitspanne von 5 Minuten

95 µl FVIIIa-Probe

+ 5 µl einer 287 nM Hirudin-Lösung
Verdünnung 1:10 zu 1 IU/ml

Zu 947 µl FVIII (10 IU/ml, in PBS-Puffer) werden 53 µl Thrombin (4,8 IE/ml) gegeben. Nach Inkubationsdauern von 30 Sekunden, 1, 2, 3,4 und 5 Minuten werden jeweils 95 µl entnommen und zu 5 µl des vorgelegtem Hirudin (287 nM) gegeben.

Für eine Negativkontrolle wird eine Probe mit 95 µl FVIII und 5 µl Hirudin angelegt.

Im Anschluss werden die vorliegenden Reaktionsgefäße 1:10 verdünnt (mit PBS-Puffer) und die FVIII-Aktivität wird im Koagulometer Amax CS 190 von 0,4 ml Probenvolumen gemessen (Kapitel 3.3.1.1.).

3.5.2. Inaktivierung des aktivierten Faktor VIII-Konzentrates durch APC

Versuchsaufbau

FVIIIa wurde für 15 Minuten mit APC in einer Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 6,3 – 200 ng/ml inkubiert.

40 µl FVIIIa (0,3 IU/100 µl)
+ 40 µl APC (6,3 – 200 ng/ml)
Inkubation für 15 Minuten

Anschließend erfolgte die fluorometrische Bestimmung der FVIIIa-Aktivität über die FXa – generierte Substratumsetzung im FXa-Generierungs-Assays.

Zur Quantifizierung der verbleibenden FVIIIa-Restaktivität wurde in jedem Versuch parallel eine APC-freie FVIIIa-Verdünnungsreihe angefertigt.

Probenvorbereitung

-Aktiviertes Protein C:

Mit TRIS-Puffer wurde eine serielle APC-Verdünnungsreihen von 6,3 ng/ml (0,11 nM) – 200 ng/ml (3,6 nM) hergestellt.

-FVIII:

90 µl FVIII (10 IU/100 µl, in HEPES-Puffer 1)
+ 5 µl Thrombin (4,8 IU/ml)

Inkubation für 2 Minuten

+ 5 µl einer 287 nM Hirudin-Lösung

Verdünnung mit TRIS-Puffer zu 0,3 IU/ 100 µl FVIIIa

Zur Erstellung der FVIIIa-Verdünnungsreihe wird wie unter 3.4. beschrieben Verfahren und Proben mit 0,16 – 0,005 IU/100 µl gebildet. Die FVIIIa-Verdünnungsserie wurde zur Quantifizierung der FVIIIa-Restaktivitäten verwendet.

Durchführung

Für die Inkubation von FVIIIa mit aktiviertem Protein C wurde folgendes in die Vertiefung einer weißen Elisa-Platten pipettiert:

40 µl FVIIIa (0,3 IU/100 µl)

+ 40 µl APC-Probe

Mischen durch Aufziehen in der Pipettenspitze

Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Als Negativkontrolle wurden in die Elisa-Platte 40 µl FVIIIa-Konzentrat (0,3 IU/100 µl) und 40 µl TRIS-Puffer gegeben.

Messansatz

25 µl FVIIIa-APC-Reagenz

bzw. Negativkontrolle / FVIII-Standard 1-6

+ 25 µl 8,9 nM FIXa

+ 50 µl der 500 µM FX-Substratlösung

+ 50 µl 25 nM FX

In dem verwendeten Fluorometer Bio-Tek FLx 800 wurde diese kinetische Messung des Substratumsatzes für eine Messdauer von 20 Minuten durchgeführt. Pro Minute erfolgte eine Messung.

3.5.3. Bestimmung der Inaktivierung von Faktor VIII durch Aptamer-gebundenes APC

Prinzip

Nach einer ersten Inkubation von aktiviertem Protein C mit APC-Aptamer erfolgte eine weitere Inkubation dieses Gemisches mit aktiviertem FVIII.

APC

+ Aptamer

15 Minuten Inkubation

FVIIIa

+ APC-Aptamer-Gemisch

15 Minuten Inkubation

Anschließend wurde die FVIII-Aktivität über die FXa vermittelte Umsetzung eines fluorogenen Substrates mit folgendem Messansatz bestimmt:

25 µl des FVIII-APC/Aptamer-Reagenz

bzw. der FVIII-Standard-Proben

+25 µl 8,9 nM FIXa

+50 µl der 500 µM FX-Substratlösung und

+50 µl 25 nM FX

Zur Quantifizierung der verbleibenden FVIIIa-Restaktivität wurde in jedem Versuch parallel eine APC-freie FVIIIa-Verdünnungsreihe angefertigt.

3.5.3.1. Einfluß der Konzentration der HS02-Aptamer-Varianten auf die Faktor VIII Aktivität

Versuchsaufbau

Zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration verschiedener Aptamer-Varianten der Originalsequenz HS02 wurden entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt.

Die Aptamer-Konzentration stieg hierbei in halblogarithmischen Schritten von 0,11 – 360 nM.

40 µl 0,3 IU/100 µl FVIIIa
+ 40 µl des Gemisches aus APC (3,6 nM) und Aptamer (0,11-360 nM)
15 Minuten Inkubation

Probenvorbereitung

-APC:

200 ng/ml (3,6 nM) in TRIS-Puffer

-Aptamer:

Die Verdünnungsreihen der einzelnen Aptamer-Kandidaten (in Aqua destillata) bestanden aus 8 halblogarithmischen Konzentrationsstufen von 0,11 – 360 nM.

-FVIII:

Die Aktivierung von Recombinate wurde wie in Kapitel 4.3.2. beschrieben durchgeführt.

Für die FVIIIa-Verdünnungsreihe wurde wie in Kapitel 3.4. beschrieben verfahren und mit TRIS-Puffer sechs Konzentrationen von 0,16 – 0,005 IU/100 µl hergestellt

Durchführung

Für die Inkubation des APC mit den Aptamer-Kandidaten sowie für 2 Kontrollansätze wurde folgendes in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert:

60 µl APC (200 ng/ml)
+ 2,2 µl der Aptamer-Proben

Vortexen

Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Kontrollansatz 1:

60 µl APC (200 ng/ml)

verbleibt ebenfalls für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Kontrollansatz 2:

60 µl TRIS-Puffer

+ 2,2 µl Aptamer 360 nM

Vortexen

Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Anschließend folgte die Inkubation des aktivierten FVIII mit dem vorinkubierten Aptamer-APC-Gemisch. Dafür wurde in jede Vertiefung einer weißen-Elisa-Platte pipettiert:

40 µl 0,3 IU/100µl FVIIIa

+ 40 µl der Aptamer-APC-Gemische bzw. Kontrollansatz

Mischen durch Aufziehen in der Pipettenspitze

Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

3.5.3.2. Kinetische Untersuchung der Faktor VIII-Aktivität bei Aptamer-gebundenem APC

Versuchsaufbau

Zur kinetischen Untersuchung des Einflusses der Aptamer-Varianten HS0288 und HS0244G auf aktiviertes Protein C wurden 0,3 IU/100 µl FVIIIa für unterschiedlich lange Zeitdauern zwischen 0-30 Minuten mit dem Aptamer-APC-Gemisch inkubiert.

30 µl FVIIIa (0,3 IU/100 µl)

+ 30 µl APC-Aptamer

Inkubation für 30, 20, 15, 10, 5, 3, 2, 1 und 0 Minuten

Probenvorbereitung

Probenvorbereitung entspricht der unter Kapitel 3.5.3.1. beschriebenen Vorgehensweise.

Durchführung

Für die Inkubation des aktivierten Protein C mit den Aptameren wurden zu APC 1,1 µl (10 pmol/µl) Aptamere HS0-288 und HS0-244G pipettiert:

300 µl APC (200 ng/ml)

+1,1 µl Aptamer (10 pmol/µl)

Vortexen

Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur

Für die anschließende Reaktion von APC-Aptamer mit FVIIIa wurde in eine weiße Mikrotiterplatte pipettiert:

30 µl FVIIIa (0,3 IU/100 µl)

+30 µl APC-Aptamer-Gemisch

Inkubation jeweils für 30, 20, 15, 10, 5, 3, 2, 1 und 0 Minuten

Jeweils 25 µl wurden von den Reaktionsgemische entnommen und zum Messansatz hinzugegeben.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Darstellung der erhobenen Messwerte wurde mit den Programmen Microsoft® Excel 2000 und Sigma Plot® 9,0 durchgeführt.

Sofern nicht anders angegeben, werden Messergebnisse als arithmetische Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung ($\pm s$) angegeben.

Zum statistischen Nachweis von Unterschieden zwischen den FVIII-Aktivitäten der Gruppe der pb- und rFVIII-Präparaten wurde als Signifikanztest der ungepaarte zweiseitige t-Test nach Student (Student-t-Test) durchgeführt. Das Ergebnis des Signifikanztests wird als p-Wert angegeben. Dabei sind die ermittelten Werte statistisch verschieden bei $p < 0,05$.

Die Quantifizierung der FVIIIa-Restaktivitäten mittels des FXa-Generierungs-Assays erfolgte durch lineare Regressionsanalyse. Aus den Messwerten von in jedem Versuch parallel mitgeführten FVIIIa-Verdünnungsserien wurden Regressionsgeraden mit Regressionsgleichung ermittelt. Für die Bestimmung der FVIIIa-Restaktivitäten wurden die ermittelten Messwerte (FXa-Aktivität [FU/min]) in die erhaltene Regressionsgleichung eingesetzt.

Die Ermittlung der Intra-assay-Variabilität des aufgebauten fluorogenen Testsystems zur Bestimmung der FVIIIa- Kofaktor-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener finaler APC-Konzentrationen erfolgte anhand des Variationskoeffizienten mit der Formel:

$$VK = s / MW * 100$$

VK = Variationskoeffizient [%], s = Standardabweichung, MW = arithmetischer Mittelwert

Die Analyse der inhibitorischen Wirkung von APC auf Aktivität der verschiedenen FVIII-Präparate und der HS02-Aptamere auf APC erfolgte durch Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration, IC_{50} (inhibitory concentration 50 %). Der IC_{50} -Wert zeigt diejenige Inhibitorkonzentration an, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Aktivität von FVIIIa bzw. APC führt.

Die IC_{50} -Werte wurden durch nichtlineare Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Logistikfunktion aus den erhaltenen Messergebnissen ermittelt. Hierzu wurden die eingesetzten Aptamer- bzw. APC-Konzentration [nM] in logarithmischer Skalierung auf der x-Achse gegen die gemessene FVIIIa-Restaktivitäten [%] aufgetragen. Durch die logarithmische Skalierung der x-Achse wird bei der graphischen Darstellung in der Regel ein sigmoidaler Kurvenverlauf erreicht.

Zur kinetischen Untersuchung des Effektes von HS02-Aptameren auf die proteolytische Aktivität von APC bezüglich der Inhibition von FVIIIa wurde die FVIIIa-Halbwertszeit in der Anwesenheit der Aptamere bzw. des unselektierten D1-Pools bestimmt.

Für die Analyse wurde die Inkubationszeit auf der x-Achse gegen die bestimmten prozentualen FVIIIa-Restaktivitäten, welche über die parallel mitgeführte FVIIIa-Verdünnungsreihe ermittelt wurden (y-Achse), aufgetragen. Die erhaltenen Messpunkte wurden mittels einer 2-Parameter-Exponentialfunktion interpoliert (Sigma Plot). Die Funktion lieferte nach entsprechender Umstellung der Inkubationszeit ($t_{1/2}$), bei der die Aktivität von FVIII durch die Spaltung durch APC im Vergleich zum Ausgangswert um 50 % abegesunken war:

$$y = a \cdot e^{-\lambda \cdot x} \quad \rightarrow \quad t_{1/2} = -\ln(50\%/a)/\lambda$$

t = Achsenabschnitt x, e = Eulersche Zahl (e = 2,718281), $t_{1/2}$ = Halbwertszeit, ln = natürlicher Logarithmus, a = Achsenabschnitt y, λ = Zerfallskonstante.

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der Aktivität in Faktor VIII-Präparaten

Die Untersuchung der Aktivität der vorliegenden FVIII-Konzentrate wurde wie in Kapitel 3.3. beschrieben durchgeführt. Tabelle 3 führt die erzielten Ergebnisse auf.

Tab. 3: Aktivität [%] in 1 IU/ml der FVIII-Präparate. Jeweils 10 IU/ml der einzelnen Konzentrate wurden 1:10 verdünnt und FVIIIa anhand der in der Tabelle aufgeführten Messverfahren bestimmt.

| Aktivität [%] in 1 IU/ml FVIII | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| FVIII-Präparat | Einstufen-Gerinnungstest | | Amidolytischer Test |
| | immunadsorbiertes FVIII-Mangelplasma | natürliches FVIII-Mangelplasma | chromogener Peptid-Substrat-Assay |
| pbFVIII-Präparate | | | |
| Haemate HS | 82 | 150 | 66 |
| Beriate P | 87 | 170 | 71 |
| Haemoctin SDH | 88 | 150 | 71 |
| Fanhdi | 84 | 160 | 68 |
| Octanate | 82 | 165 | 92 |
| MW ± s pbFVIII Präparate | 85 ± 2,5 | 159 ± 8 | 74 ± 9 |
| rFVIII-Präparate | | | |
| Advate | 59 | 56 | 44 |
| Recombinat | 57 | 50 | 42 |
| Kogenate | 75 | 91 | 57 |
| Helixate Nex Gen | 65 | 155 | 56 |
| Refacto | 51 | 69 | 33 |
| MW ± s rFVIII-Präparate | 61 ± 8 | 84 ± 35 | 46 ± 9 |

Aus den in Tabelle 3 dargestellten Versuchsergebnissen wurden diskrepante Messwerte der FVIII-Konzentrate innerhalb der drei Bestimmungen ersichtlich. Deutlich ausgeprägt waren die Messunterschiede bei der FVIII-Bestimmung von plasmabasierten Konzentraten. Mit Ausnahme von Helixate Nex Gen fallen die Ergebnisabweichungen bei der Untersuchung der rekombinanten Präparate geringer aus.

Die koagulometrischen Überprüfungen lieferten für alle FVIII-Präparate (mit Ausnahme von Octanate) höhere Aktivitäten als der chromogene Test.

Innerhalb der beiden koagulometrischen Gerinnungsteste wiesen plasmabasierte Konzentrate bei der Messung mit nativem FVIII-Mangelplasma deutlich höhere Werte als in der Bestimmung mit immunadsorbiertem Mangelplasma auf. Im Vergleich lagen die FVIII-Werte

um 71-101 % (MW = 88 ± 10) höher. Innerhalb der Gruppe der rFVIII-Konzentrate zeigten nur Kogenate und Helixate Nex Gen in der Bestimmung mit natürlichem Mangelplasma auffallend höhere Aktivitäten.

Die chromogene FVIII-Bestimmung lieferte für alle FVIII-Konzentrate (mit Ausnahme von Octanate) die niedrigsten Messwerte.

Sowohl bei den Mangelplasma-Assays als auch im amidolytischen Test-Verfahren wurden bei den plasmabasierten FVIII-Konzentraten höhere Aktivitäten als bei den rekombinanten Präparaten (Ausnahme Helixate Nex Gen) erreicht. Die festgestellten Aktivitätsunterschiede zwischen diesen Präparate-Gruppen waren statistisch signifikant (t-test, $p < 0,05$). Die Darstellung der gemessenen Aktivitäten als Gesamtmittel der plasmabasierten und rekombinanten FVIII-Präparate in Abbildung 8 verdeutlicht dieses Versuchsergebnis. Aus Abbildung 8 sind auch Standardabweichungen und Signifikanzgrößen ersichtlich.

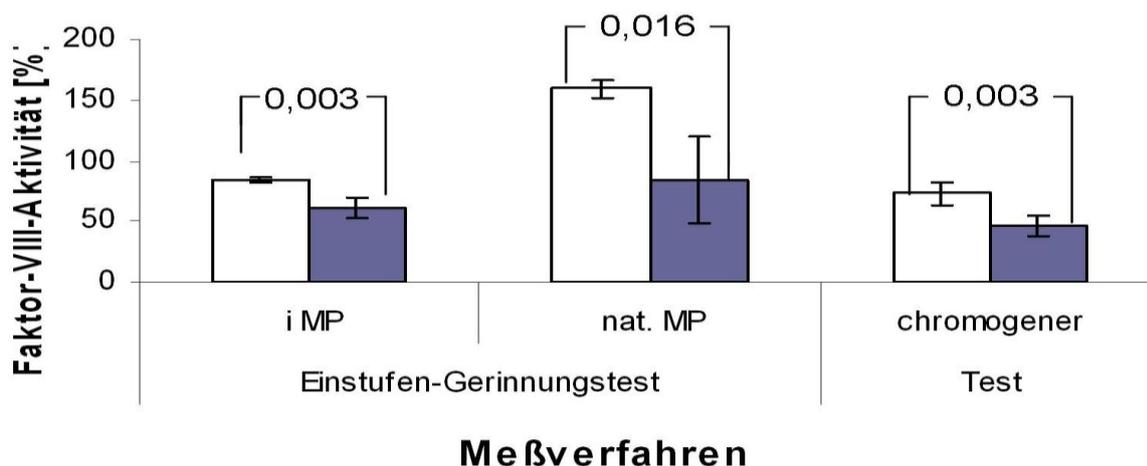


Abb. 8: Darstellung der Aktivität [%] in FVIII-Konzentraten als Gesamtmittel der plasmabasierten (□) –und rekombinanten (■) Präparate und der entsprechenden Signifikanzen und Standardabweichungen. Die Bestimmung erfolgte ausgehend von 1 IU/ml FVIII im Einstufen-Gerinnungstest mit immunadsorbiertem FVIII-Mangelplasma (i MP) und natürlichem FVIII-Mangelplasma (nat. FVIII MP) sowie mit chromogener Messung.

4.2. Aktivierung von Faktor VIII-Präparaten in Abhängigkeit von der Thrombin-Konzentration

4.2.1. Überprüfung des Einflusses von Hirudin auf die Aktivität von Faktor VIII

Die nachfolgend in den Kapitel 4.2.3. und 4.2.4. dargestellten Untersuchung der Thrombin-vermittelten Aktivierung von FVIII-Konzentraten erforderte den Einsatz eines Thrombin-

Inhibitors. Zu diesem Zweck wurde in der Arbeit synthetisches Hirudin (Refludan®) verwendet. Dieses ermöglicht nach einer bestimmten Inkubationsdauer von FVIII und Thrombin die Beendigung der Aktivierungsreaktion.

Zur Überprüfung der Beeinflussung der FVIII-Aktivität durch Hirudin wurde in diesem Experiment dessen Wirkung auf die Aktivitätsbestimmung von 1 IU/ml Faktor VIII ermittelt. Als FVIII-Konzentrat wurde das Präparate Recombinate (Baxter) eingesetzt.

Für die Herstellung einer logarithmischen Hirudin-Verdünnungsserie von 100 – 0,1 ng/ml wurde Hirudin (1 mg/ml) zunächst 1:100 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 5,5 µl entnommen und zu 544,5 µl FVIII (1 IU/ml) gegeben. Der Probe wurden nach der Durchmischung 55,5 µl entnommen und diese zu 500 µl vorgelegtem FVIII (1 IU/ml) pipettiert. Für die weiteren zwei Verdünnungen wurde entsprechend vorgegangen.

Eine Negativkontrolle bestand aus 1 IU/ml FVIII. Alle Verdünnungen wurden in PBS-Puffer durchgeführt.

Die Ermittlung der FVIII-Aktivitäten erfolgte im Einstufen-Clotting-Test (Amax CS 190) unter der Verwendung von immunadsorbiertem FVIII-Mangelplasma. Die erhaltenen Ergebnisse der Einzelbestimmung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: FVIII-Aktivität (1 IU/ml) in Gegenwart einer logarithmischen Hirudin-Verdünnungsserie von 0,1- 100 ng/ml.

| Hirudin [ng/ml] | FVIIIa [%] |
|-----------------|------------|
| 0 | 75 |
| 0,1 | 74 |
| 1 | 79 |
| 10 | 70 |
| 100 | 60 |

Die in Tabelle 4 angegebenen Messwerte zeigen eine deutliche Reduzierung der Aktivität von 1 IU/ml FVIII ab einer Hirudin-Konzentration von 100 ng/ml (14,4 nM).

4.2.2. Überprüfung des Einflusses von Hirudin auf die Aktivität von Thrombin

Als weiterer Versuchsschritt wurde überprüft, welche Menge an Thrombin durch die Hirudinkonzentration von 100 ng/ml inaktiviert werden.

Unter Verwendung von PBS-Puffer wurden Reaktionsgemische aus finalen Konzentrationen von 5,4,3,2 und 1 IU/ml Thrombin und 100 ng/ml Hirudin hergestellt. Die entsprechenden Kontrollansätze enthielten anstelle des Hirudins den verwendeten Puffer.

Die vorhandenen Thrombin-Aktivitäten wurden durch fluorogene Messung mit einem Thrombin Peptid-Substrat mit folgendem Messansatz ermittelt:

100 μ l Thrombin-Hirudin-Gemisch bzw. die entsprechenden Kontrollen
 + 100 μ l eines FIIa-Peptid-Substrats (1 μ M)

Die erzielten Messwerte sind in Abbildung 9 dargestellt.

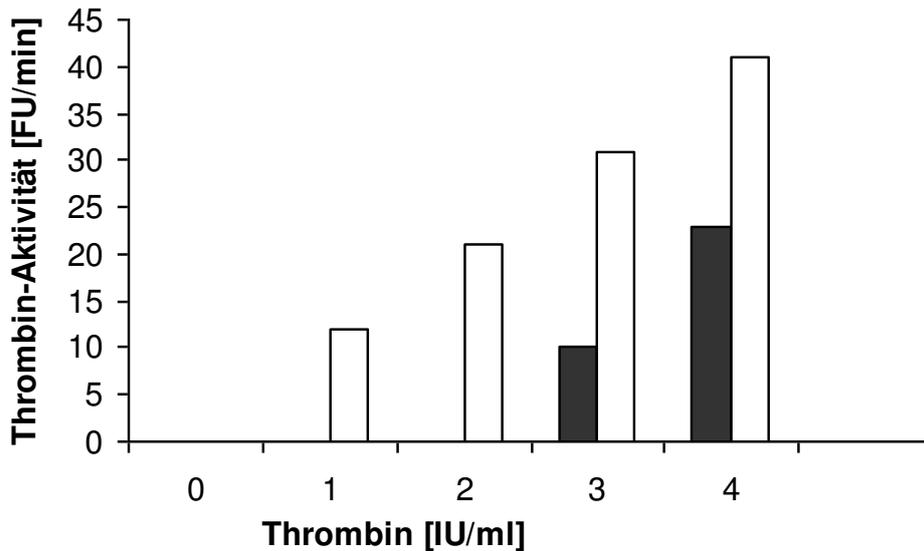


Abb. 9: Thrombin-Aktivität [FU/min] unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen in Gegenwart von 100 ng/ml Hirudin (•) und der entsprechenden Thrombin-Kontrollwerte ohne Hirudineinwirkung (□).

Die in Abbildung 9 angegebenen Ergebnisse zeigen, dass mit einer Hirudin-Konzentration von 100 ng/ml Thrombin vollständig inaktiviert werden konnte, wenn dieses bis zu einer Konzentrationshöhe von 2 IU/ml vorlag.

4.2.3. Bestimmung der Faktor VIII-Aktivierung mittels koagulometrischer Messung

Von jedem FVIII-Präparat wurde eine 1 ml Versuchsprobe mit 10 IU/ml (HEPES-Puffer 1) hergestellt. 90 μ l dieser Proben wurden anschließend mit 5 μ l Thrombin (in HEPES-Puffer 2) in steigenden Konzentrationen inkubiert:

- 90 μ l FVIII (10 IU/ml)
- + 5 μ l Thrombin in seriell steigenden Konzentrationen von 0,3-19 IU/ml
- 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur
- + 5 μ l einer 287 nM Hirudin-Lösung.

Die Negativkontrollen enthielten 90 µl der FVIII-Präparate (10 IU/ml) 5 µl HEPES-Puffer 1 und 5 µl des 287 nM Hirudin.

Durch diesen Versuchsansatz lag Hirudin in einer finalen Konzentration von 100 ng/ml (14,4 nM) vor. Unter Bezugnahme auf die in Kapitel 4.2. erhaltenen Ergebnisse ist diese Menge an Hirudin ausreichend, um die größte finale Thrombin-Konzentration von 1 IU/ml vollständig inaktivieren zu können.

Zur koagulometrischen FVIIIa-Bestimmung im Amax CS190 wurden die Thrombin-FVIII-Gemische sowie die Kontrollproben 1:10 verdünnt (HEPES-Puffer 1).

Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5: ausgebildete Aktivität [%] der Faktor VIII-Konzentrate nach Inkubation mit Thrombin. Von jedem FVIII-Präparat wurden 10 IU/ml mit den in der Tabelle aufgeführten finalen Thrombin-Konzentrationen für eine Minute inkubiert. Die koagulometrisch aPTT-basierte Aktivitätsbestimmung erfolgte aus 1 IU/ml Faktor VIII nach einer 1 : 10 Verdünnung der Ansätze in Hepes-Puffer 1. MW= arithmetischer Mittelwert, n.g. = nicht geronnen.

Aktivität [%] pbFVIII-Präparate

| Thrombin [IU/ml] | Beriate P | Haemate HS | Fanhdi | Octanate | Haemoctin SDH | MW ± s pbFVIII |
|-------------------------|------------------|-------------------|---------------|-----------------|----------------------|-----------------------|
| 0 | 63 | 62,5 | 64,5 | 66,5 | 57,5 | 63 ± 3 |
| 0,02 | 77 | 90,5 | 98 | 81 | 71,5 | 84 ± 11 |
| 0,03 | 85 | 110 | 110,5 | 101 | 79 | 97 ± 14 |
| 0,06 | 92,5 | 138,5 | 117 | 92 | 79 | 107 ± 20 |
| 0,12 | 109,5 | 152,5 | 150 | 89 | 104,5 | 121 ± 29 |
| 0,25 | 57 | 142,5 | 49,5 | 51 | 67 | 73 ± 39 |
| 0,5 | 66 | 118,5 | 67,5 | 52,5 | 51,5 | 71 ± 27 |
| 1 | 10,5 | 105 | 10,7 | n.g. | 13 | 35 ± 47 |

Aktivität [%] rFVIII-Präparate

| Thrombin [IU/ml] | Advate | Helixate Nex Gen | Refacto | Kogenate | Recombinante | MW ± s rFVIII |
|-------------------------|---------------|-------------------------|----------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| 0 | 31,5 | 40 | 15,5 | 39 | 35 | 32 ± 9 |
| 0,02 | 36 | 46,5 | 53 | 67 | 41,5 | 49 ± 11 |
| 0,03 | 49,5 | 36,5 | 62 | 69 | 50 | 53 ± 11 |
| 0,06 | 33,5 | 38 | 38,5 | 53 | 39 | 40 ± 7 |
| 0,12 | 35,5 | 21,5 | 42 | 49,5 | 50 | 40 ± 11 |
| 0,25 | 28,5 | 15,5 | 43,5 | 26 | 29,5 | 29 ± 9 |
| 0,5 | 26,5 | 9,5 | 36 | 4,5 | 21,5 | 20 ± 11 |
| 1 | 4 | n.g. | 6 | 3,5 | 0 | 3 ± 2 |

Die in Tabelle 5 abgebildeten Messergebnisse zeigen, dass die von der Thrombin-Konzentration abhängige FVIIIa-Generierung aller Gerinnungspräparate mit deutlicher

Ausbildung eines Maximums verlief. Den Aktivitätsgipfeln folgte bei steigender Thrombin-Konzentration ein Aktivitätsverlust.

Die Thrombinkonzentrationen mit denen die beiden Faktorenkonzentrat-Gruppen die höchsten Aktivitäten ausbildeten sind unterschiedlich. Aus Plasma hergestellte FVIII-Konzentrate erzielten die Maxima ihrer Aktivitäten mit Ausnahme von Octanate bei 0,12 IU/ml Thrombin. Rekombinant hergestellte Produkte benötigen hierzu nur 0,03 IU/ml (Ausnahme Helixate Nex Gen 0,02 IU/ml).

Die erzielten Messergebnisse ergeben signifikante Aktivitätsunterschiede zwischen der Gruppe der pb- und rFVIII-Präparate (t-Test, $p < 0,01$). PbFVIII-Präparate erreichten im Mittel Aktivitätsmaxima von $MW = 121 \% \pm 29$. Im Gegensatz dazu bildeten die untersuchten rFVIII-Konzentrate eine mittlere maximale Aktivität von $MW = 53 \% \pm 11$ aus.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Aktivitätsbestimmung von FVIII-Konzentraten in Kapitel 4.1. unterscheiden sich die beiden Präparate-Gruppen bereits ohne die Zugabe von Thrombin in ihren Ausgangsaktivitäten. Dabei besaßen die pbFVIII-Konzentrate bereits ohne den Einfluss von Thrombin Messwerte, deren Höhe von den rekombinanten Präparaten auch nicht nach vorangehender, maximaler Aktivierung durch Thrombin erreicht wurden (Ausnahme Kogenate). Im Vergleich zu den Ergebnissen der entsprechenden FVIII-Bestimmung in Kapitel 4.1. liegen die Ausgangsaktivitäten allerFVIII-Präparate in niedrigeren Messbereichen.

4.2.4. Bestimmung der FVIII-Aktivierung mittels eines fluorogenen Assays

Zur fluorogenen FVIII-Bestimmung wurden die einzelnen Präparate entsprechend der Vorgehensweise im zuvor durchgeführten Versuch mit Thrombin aktiviert.

Der gebildete FVIIIa wurde 1:64 mit HEPES-Puffer 3 verdünnt und mit folgendem Messansatz (in TRIS-Puffer) die Generierung von FXa fluorogen bestimmt:

- 25 μ l FVIIIa
- + 25 μ l 8,9 nM FIXa
- +50 μ l 500 μ M FX-Substratlösung
- +50 μ l 25 nM FX.

Die erhaltenen Messwerte sind in Abb. 10 aufgeführt.

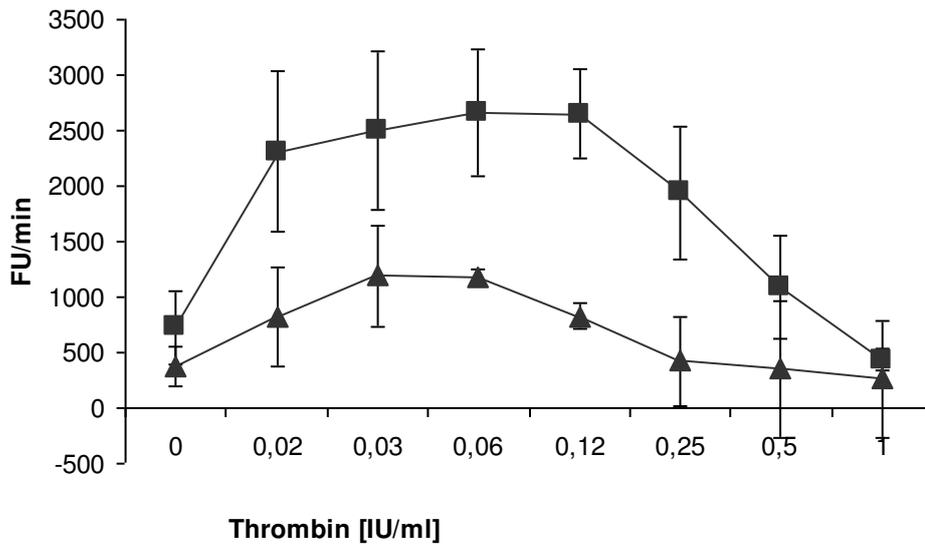


Abb. 10: Aktivierung und Inaktivierung von FVIII durch Thrombin. Die Aktivitäts-Bestimmung des FVIII erfolgte fluorometrisch anhand der Fähigkeit von FVIIIa als FIXa-Kofaktor bei FXa-Bildung zu fungieren. Darstellung der FVIII-Aktivität (FU/min) als arithmetische Mittelwerte der plasmabasierten (■) und rekombinanten (▲) FVIII-Präparate.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigen die arithmetischen Mittelwerten der pb- und rFVIII-Präparaten übereinstimmend mit den Ergebnissen der koagulometrischen Bestimmung, nach Thrombin-vermittelter Aktivierung signifikant höhere Aktivitäten von plasmabasierten Produkten (t-Test, $p < 0,02$).

Aus Plasma gewonnene FVIII-Konzentrate entwickelten mit steigender Thrombinkonzentration Aktivitätsplateaus, die sich über einen finalen Konzentrationsbereich von 0,03-0,12 IU/ml Thrombin erstrecken. Ein solches Muster war bei rFVIII-Präparaten nur geringgradig ausgebildet. Thrombin erreichte die maximale Aktivierung der rFVIII-Präparate im Bereich von 0,03 bzw. 0,06 IU/ml. Auffällig verhielt sich Refacto. Dieses Gerinnungspräparat erzielte mit einer hohen Thrombinkonzentration (0,5 IU/ml) die höchste Aktivität.

4.3. Überprüfung des Einflusses von verschiedenen Faktor VIII-Konzentrationen auf deren Thrombin-vermittelte Aktivierung

Als Vertreter der Gruppe der plasmabasierten FVIII-Konzentrate wurde von dem Präparat Haemate HS Proben mit 2,5, 5 und 10 IU/ml hergestellt. Vertretend für die rekombinanten FVIII-Konzentrate wurde von Kogenate Proben mit 10, 20 und 40 IU/ml angefertigt. Anschließend erfolgte die FVIII-Aktivierung durch Thrombin entsprechend des beschriebenen Versuchsablaufs in Kapitel 4.2. Zur FVIIIa-Bestimmung wurden alle Proben

auf 1 IU/ml mit HEPES-Puffer 1 adjustiert. Von jeder Probe wurde ein Messwert mittels koagulometrischer Messung bestimmt.

Tab. 6: ausgebildete Faktor VIII-Aktivität [%] unterschiedlicher Konzentrationen von Haemate HS und Kogenate nach Inkubation mit einer seriellen Thrombin-Verdünnungsreihe mit finalen Konzentrationen von 0,02-1 IU/ml. Die FVIII-Aktivität wurde durch koagulometrische Einstufen-Messung von 1 IU/ml FVIII bestimmt.

| Thrombin [IU/ml] | Aktivität [%] von Haemate HS | | | Aktivität [%] von Kogenate | | |
|---------------------|------------------------------|---------|-----------|----------------------------|----------|----------|
| | 10 IU/ml | 5 IU/ml | 2,5 IU/ml | 10 IU/ml | 20 IU/ml | 40 IU/ml |
| 0 | 60 | 76 | 61 | 39 | 32 | 37 |
| 0,02 | 109 | 124 | 132 | 79 | 50 | 49 |
| 0,03 | 118 | 175 | 159 | 51 | 43 | 55 |
| 0,06 | 138 | 127 | 167 | 51 | 40 | 41 |
| 0,12 | 118 | 88 | 119 | 26 | 46 | 54 |
| 0,25 | 103 | 74 | 116 | 16 | 12 | 48 |
| 0,5 | 66 | 62 | 73 | 7 | 7 | 12 |
| 1 | 37 | 0 | 49 | 3 | 3 | 7 |

Die Messwerte in Tabelle 6 zeigen, dass für das rekombinante Konzentrat auch bei steigender FVIII-Menge, bereits die niedrigste Thrombin-Konzentration von 0,02 IU/ml zur maximalen Aktivitätsausbildung ausreichte. Bei höheren FVIII-Konzentrationen von 20 und 40 IU/ml hielt sich die Aktivität über einen großen Bereich ansteigender Thrombin-Konzentrationen auf einem Aktivitätsplateau.

Das Plasma-Präparat benötigte trotz Reduzierung der FVIII-Konzentration zur höchsten Aktivierung nicht weniger Thrombin. Die maximalen Aktivitäten waren deutlich höher als bei rekombinanten Konzentraten und wurden durch 0,03 und 0,06 IU/ml Thrombin erreicht.

4.4. Etablierung eines Assays zum Nachweis eines Thrombin-Inhibitors (Thrombin-Neutralisationstest)

Zur Überprüfung der Nachweisbarkeit einer Thrombin-inhibierenden Substanzen durch das im nachfolgenden Thrombin-Neutralisationstest angewendete Testprinzip wurden jeweils 80 µl einer Thrombin-Lösung für 20 Minuten mit je 80 µl einer seriellen Hirudin-Verdünnungsreihe (in PBS-Puffer) inkubiert. Die Endkonzentration von Thrombin betrug 4,5 nM (0,6 IU/ml) und die finalen Hirudin-Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 0,07 – 4,5 nM (0,5 – 300 ng/ml). Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden von den einzelnen Hirudin-Thrombin-Proben jeweils 50 µl entnommen und in Mikrotiterplatten zu 50 µl vorgelegtem HEPES-Puffer 1 gegeben. Die vorliegenden Thrombin-Aktivitäten wurden nach Zugabe von 50 µl eines Thrombin-Substrates (0,5 µM) fluorometrisch bestimmt. Von jeder Probe wurden

jeweils zwei wells der Mikrotiterplatte befüllt. Die erhaltenen Messwerte sind in Abbildung 11 abgebildet.

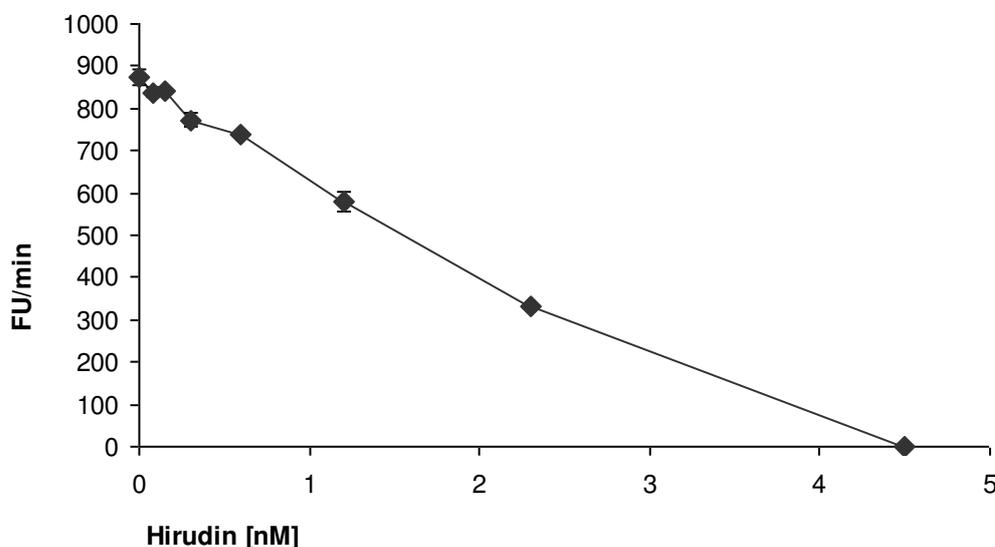


Abb. 11: Aktivität der finalen Thrombin-Konzentration von 0,6 IU/ml (4,5 nM) als FU/min nach Inkubation mit den in der Graphik dargestellten Hirudin-Konzentrationen.

Wie aus den in Abbildung 11 dargestellten Versuchsergebnissen ersichtlich wird, lag bei einem molaren Thrombin-Hirudin-Verhältnis von 1:1 eine vollständige Inhibierung von Thrombin vor.

Erkennbar wird ein hemmender Effekt von Hirudin auf die Aktivität des 4,5 nM (0,6 IU/ml) Thrombins ab einer Hirudin-Konzentration von 0,3 nM. Aufgrund dieses Versuchsergebnisses ist davon auszugehen, dass mit diesem Testprinzip ein Thrombin-Inaktivator nachzuweisen ist, der bei vergleichbarer Affinität zu Thrombin mindestens über ein fünfzehntel der Stoffmengenkonzentration von Thrombin verfügt.

4.5. Thrombin-Neutralisationstest

Zur Untersuchung des Einflusses von FVIII-Produkten auf die Thrombin-Aktivität wurden jeweils 50 µl aus einer Thrombin-Lösung mit 50 µl der Faktor VIII-Präparate (10 IU/ml HEPES-Puffer 1) inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0 Minuten. Bei der Überprüfung von Haemoctin SDH und Kogenate lag Thrombin in einer Endkonzentrationen von 0,6 IU/ml vor. Die Versuche mit den Konzentraten Haemate HS, Beriate P, Fanhdi und Octanate, Helixate Nex Gen und Advate erfolgte mit finalen Thrombin-Konzentrationen von 0,3 IU/ml. Nach Zugabe von 50 µl eines 0,5 µM fluorogenen Thrombin-Peptid-Substrates wurde die FIIa-generierte Substratumsetzung bestimmt. Für jede FVIII-Thrombin-Probe wurde parallel eine Negativkontrolle (50 µl HEPES-Puffer 1, 50 µl Thrombin und 50 µl 0,5 µM Peptid-Substrat) angelegt.

Die in Abbildung 12 aufgeführten Messergebnisse geben die Thrombin-Aktivitäten als Gesamtmittel aus den untersuchten plasmabasierten (Haemate HS, Beriate P, Fanhdi und Octanate) und rekombinanten FVIII-Präparaten (Helixate Nex Gen, Advate) sowie der entsprechenden Kontrollwerte an. Die Ergebnisse aus der Messung mit 0,6 IU/ml sind nicht aufgeführt.

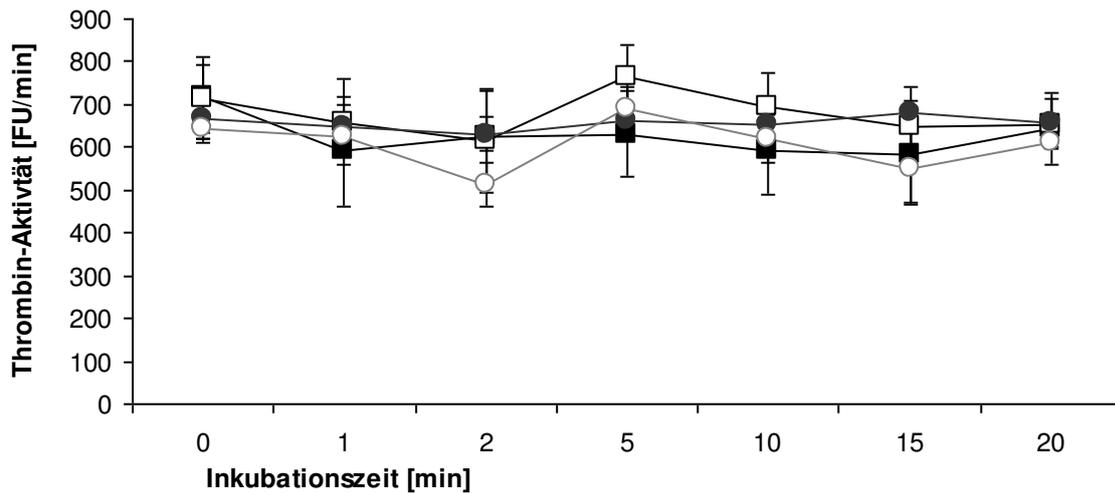


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der Thrombin-Aktivität bei An -und Abwesenheit von FVIII-Präparaten Die Inkubationen fanden für die im Diagramm aufgeführten Zeiten statt. Die gemessenen Thrombin-Aktivitäten sind als Gesamtmittel der getesteten pb - und rFVIII-Präparate dargestellt (n pbFVIII = 4, n rFVIII = 2): ■ = II a in Gegenwart von pbFVIII-Präparaten, □ = II a-Kontrollwerte ohne Einfluss von pbFVIII-Präparaten, ● = II a in Gegenwart von rFVIII-Präparaten, ○ = II a-Kontrollwert ohne Einfluss von rFVIII-Präparaten. n = Anzahl

Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse geben keine Hinweise auf die Beeinflussung der Thrombin-Aktivität durch die FVIII-Konzentrate.

4.6. Wirkung von APC auf aktivierte Faktor VIII-Präparate

Die Untersuchung der Wirkung von APC auf aktivierte FVIII-Konzentrate erfolgte wie in Kapitel 3.4. beschrieben anhand einer seriellen APC-Verdünnungs-Serie. APC lag in finalen Konzentrationen von 14,5-0,25 nM vor. Zum Vergleich der Empfindlichkeiten der FVIII-Produkte gegenüber APC wurden für die einzelnen FVIII-Präparate die IC_{50} -Werte mit Hilfe einer nicht-linearen Interpolation der Messwerte bestimmt. Abbildung 12 zeigt die erstellten Regressions-Linien zur Bestimmung der IC_{50} -Werte. Die erhaltenen Versuchsergebnisse sind in Abbildung 13 und Tabelle 7 abgebildet.

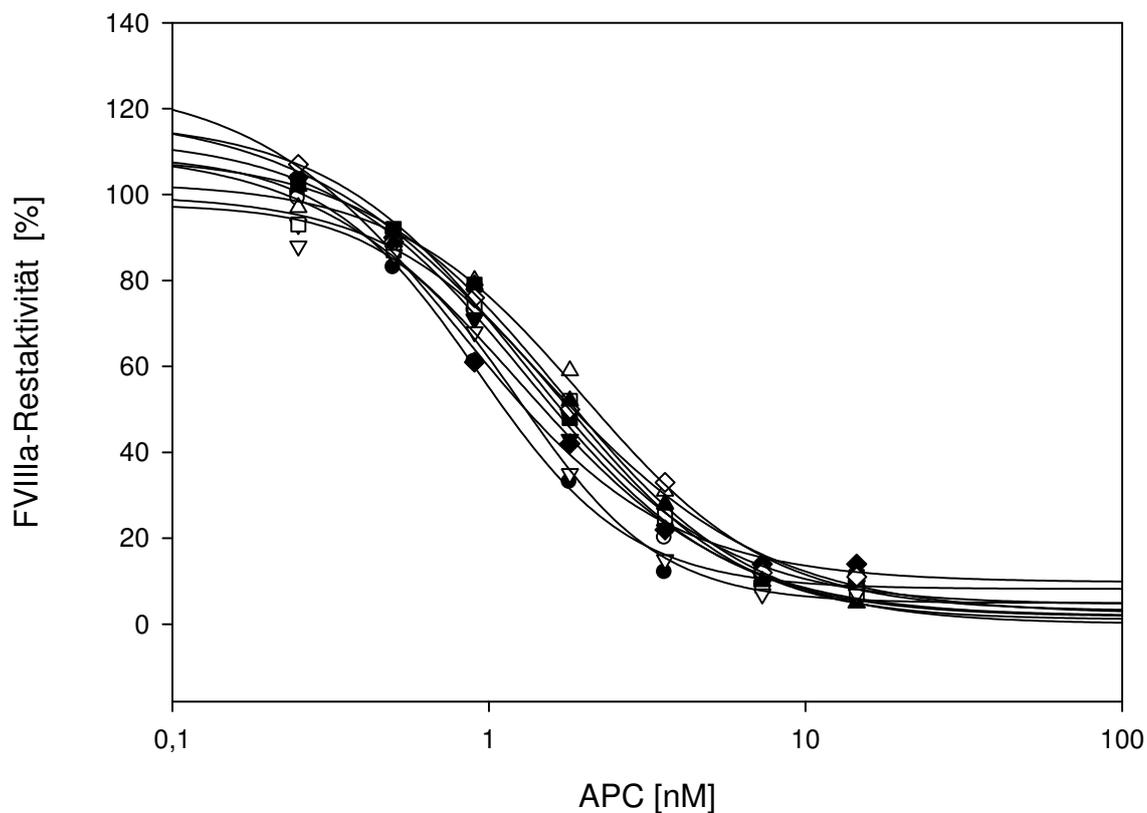


Abb. 13: Darstellung der Restaktivitäten [%] der FVIII-Präparate nach Inkubation mit einer APC-Verdünnungs-Serie. Ermittlung der FVIIIa-Restaktivitäten über APC-freie FVIIIa Verdünnungsserie. Haemate HS (□), Beriate P (◆), Octanate (◇), Haemoctin SDH (▲), Fanhdi (▽) Recombinate (●), Kogenate (○), Refacto (Δ), Advate (▼), Helixate Nex Gen (■).

Tab. 7: Ermittelte IC₅₀-Werte und Standardabweichungen der APC-vermittelten Inaktivierung der Faktor VIII-Präparate

| Faktor VIII-Präparat | IC ₅₀ [nM] | ±s |
|----------------------|-----------------------|------|
| Haemate HS | 1,77 | 0,13 |
| Beriate P | 0,81 | 0,07 |
| Octanate | 1,35 | 0,15 |
| Haemoctin SDH | 1,67 | 0,12 |
| Fanhdi | 1,27 | 0,11 |
| Recombinat | 0,92 | 0,05 |
| Kogenate | 1,32 | 1,58 |
| Refacto | 1,99 | 1,72 |
| Advate | 1,26 | 1,67 |
| Helixate Nex Gen | 1,28 | 0,14 |

Die in Abbildung 13 und Tabelle 7 aufgeführten Ergebnisse ergeben einen einheitlichen Verlauf der APC-vermittelten Aktivitätsabnahme der untersuchten Faktor VIII-Präparate mit vergleichbaren IC_{50} -Werten in einem Bereich von 0,81 – 1,99 nM.

4.7. Einfluß des APC-Aptameres HS02 und dessen verkürzteVarianten auf die APC-vermittelte Inaktivierung von Faktor VIIIa

Für die Untersuchung der Wirkung des APC-Aptamers HS02 und dessen Varianten auf die APC-vermittelte Inaktivierung von FVIIIa war die Etablierung eines geeigneten Testsystems erforderlich. Zu diesem Zweck wurde ein mehrstufiges Testverfahren aufgebaut, in welchem FVIIIa (Recombinat, Baxter) durch APC inaktiviert wird.

Der erste Schritt dieses Testsystems bestand aus der Aktivierung von FVIII durch Thrombin.

Im zweiten Schritt findet die Inkubation des aktivierten FVIII mit APC statt.

Die Quantifizierung der verbleibenden FVIIIa-Kofaktor-Aktivität wurde anschließend in einem fluorogenen Assay über die FXa-Generierung ermittelt. Die Bestimmung der FVIIIa-Restaktivität erfolgt anhand einer mitgeführten FVIIIa-Verdünnungsreihe.

Die betreffenden Versuche zum Aufbau des Testsystems sind in den Kapiteln 4.7.1. bis 4.7.3. aufgeführt.

4.7.1. Thrombin-vermittelte Aktivierung des Faktor VIII-Konzentrates Recombinate

Die Untersuchung der durch Thrombin induzierten Aktivierung von 10 IU/ml Recombinate erfolgte wie in Kapitel 3.5.1. beschrieben. Abbildung 14 führt die Untersuchung des Einflusses der Thrombin-Konzentration auf FVIII auf. Abbildung 15 zeigt die Abhängigkeit der Thrombin-vermittelten FVIII-Aktivität von der Inkubationszeit bei einer finalen Thrombinkonzentration von 0,25 IU/ml im Versuchsansatz.

Die Abbildungen zeigen die Messergebnisse von durchgeführten Einzelbestimmungen.

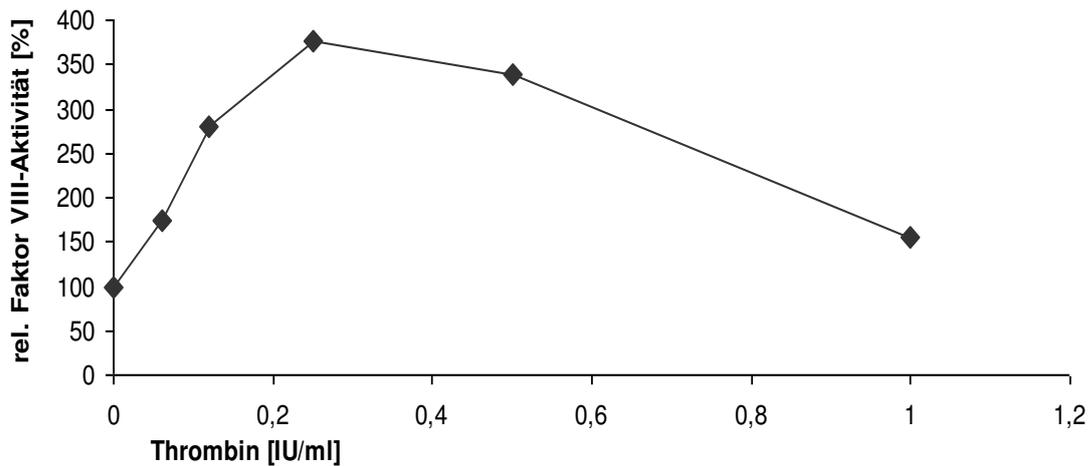


Abb. 14: Aktivierung/Inaktivierung des FVIII-Präparates Recombinate durch Thrombin. Die Inkubation von FVIII [10 IU/ml] mit den in der Graphik dargestellten finalen Thrombin-Konzentrationen erfolgte für eine Minute. FVIIIa wurde mittels koagulometrischer Messung mit immunadsorbiertem Mangelplasma bestimmt. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten von Recombinate in Prozent, die sich auf den thrombin-freien FVIII-Kontrollwert beziehen.

Es wird ersichtlich, dass Recombinate die höchste Aktivität durch 0,25 IU/ml Thrombin im Testansatz ausbildet.

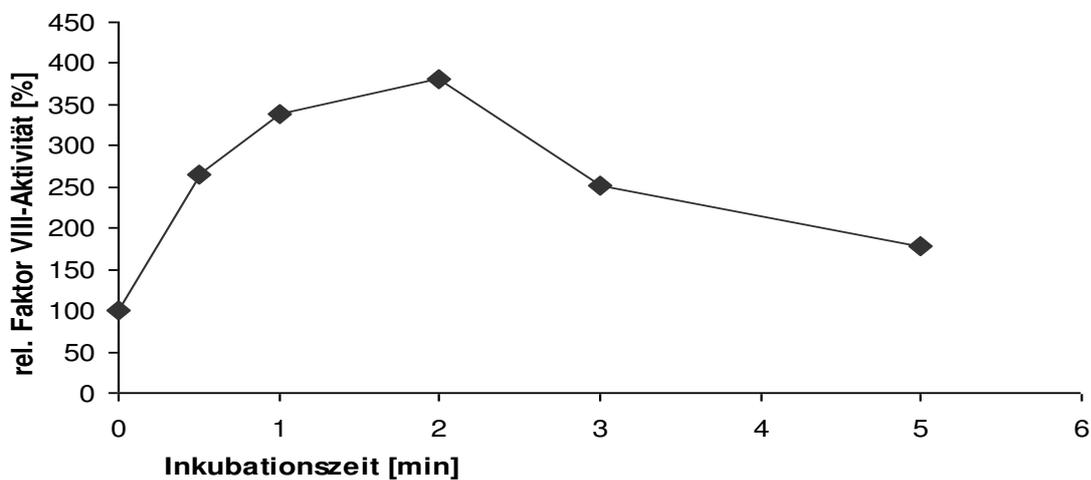


Abb. 15: Thrombin-vermittelte FVIII-Aktivierung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Die Inkubation von 10 IU/ml FVIII mit Thrombin erfolgte für die in der Graphik dargestellten Inkubationszeiten. Die Angabe der relativen FVIII-Aktivitäten ergeben sich aus dem Sofort-Messwert, der unmittelbar nach Zusammenfügung von Thrombin und FVIIIa bestimmt wurde (0 Minuten Inkubationszeit).

Abbildung 15 zeigt, dass unter Einsatz der zuvor festgestellten optimalen Thrombinkonzentration von 0,25 IU/ml bei der Inkubationszeit von zwei Minuten die höchste FVIII-Aktivierung von Rekombinate quantifiziert werden konnte.

4.7.2. APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIIa (Recombinat)

Zur Feststellung der in den Aptamer-Versuchen einzusetzenden APC-Konzentrationen wurde wie in Kapitel 3.5.2. erläutert vorgegangen. Abbildung 16 zeigt das erhaltene Versuchsergebnis.

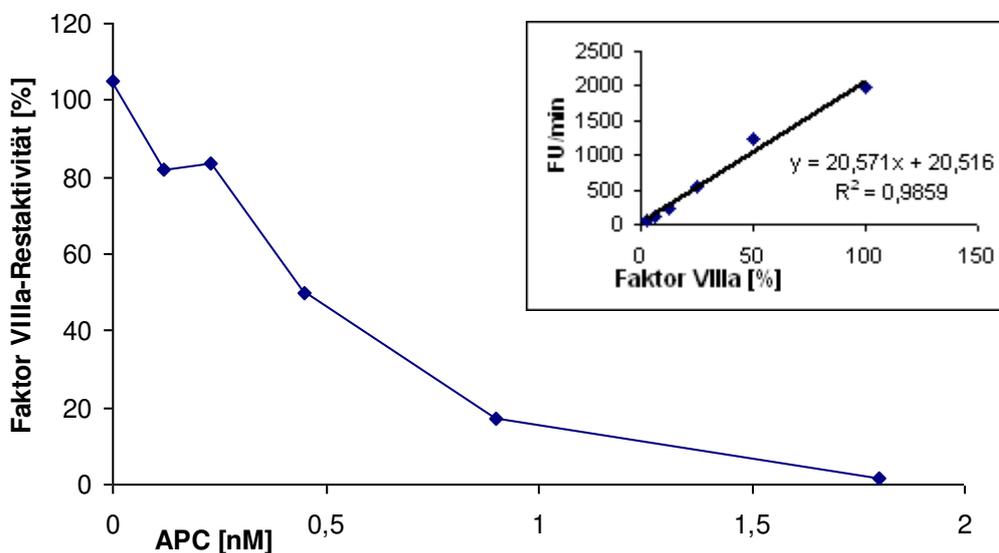


Abb. 16 : APC-induzierte Inaktivierung von 0,3 IU/ml FVIIIa (Recombinat) durch die im Diagramm dargestellte finale APC- Konzentrationen nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten. Die Quantifizierung der FVIII-Restaktivitäten erfolgte anhand der mitgeführten und in der eingefügten Graphik dargestellten FVIIIa-Verdünnungsreihe.

Die in Abbildung 16 abgebildete konzentrationsabhängige Inaktivierungen des FVIIIa (Recombinat) zeigt, dass bei 1,8 nM APC eine Restaktivität von lediglich 1 % verblieb.

4.7.3. Intra-Assay-Varianz

Anhand der Intra-Assay-Varianz wurden die Schwankungen eines Messwertes innerhalb einer Messserie überprüft.

Zur Erstellung der Testansätze mit den in Tabelle 8 aufgeführten APC-Konzentrationen wurde wie in Kapitel 3.5.2. beschrieben vorgegangen. Die antikoagulatorische Wirkung des APC wurde durch FVIIIa-Inaktivierung in voneinander getrennten Durchläufen in Dreifach-Werten bestimmt. Durchgeführt wurden die Versuche mit dem FVIII-Präparat Recombinate. Tabelle 8 stellt die aus den erzielten Ergebnissen berechneten arithmetischen Mittelwerte sowie Standardabweichungen und Variationskoeffizient dar.

Tab. 8: Intra-Assay-Variabilität des fluorogenen Testsystems zur Bestimmung der FVIIIa- Kofaktor-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener finaler APC-Konzentrationen.

| APC [nM] | x Faktor VIIIa- Restaktivität [%] n = 3 | ± s | VK [%] |
|----------|---|------|--------|
| 1,8 | 6 | 0,41 | 6,83 |
| 0,9 | 17 | 0,41 | 2,41 |
| 0,45 | 35 | 1,08 | 3,09 |
| 0,23 | 69 | 1,41 | 2,04 |
| 0,12 | 90 | 2,48 | 2,76 |
| 0,06 | 86 | 2,16 | 2,51 |
| 0,03 | 100 | 2,45 | 2,45 |

Die berechneten Variationskoeffizienten liegen unter 10 % in einem Bereich zwischen 2,04 und 6,83 %. Diese Resultate stellen relativ geringe Variationskoeffizienten dar und zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit des fluorogenen Testsystem an.

4.7.4. Einfluß der HS02-Aptamer-Varianten auf die APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIIa

Die Bewertung des Einflusses der HS02-Aptamer-Varianten auf die APC-induzierte FVIIIa-Inaktivierung des Präparates Recombinate wurde wie in Kapitel 3.5.3.1. beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden die Aptamere in das Testsystem in halblogarithmisch ansteigenden Konzentrationsstufen. Die maximale Aptamer-Konzentration von 360 nM bedeutete einen 100-fachen molaren Überschuß zur eingesetzten APC-Konzentration im Testansatz. Die Interpolation der Messwerte diente der Bestimmung der IC₅₀-Werte aller Aptamer-Varianten. Beispielhaft für die in der gesamten Versuchsreihe erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 17 die interpolierten Messwerte der Originalsequenz HS02-88 aufgeführt. In Tabelle 9 sind die über die Aptamer-Konzentrationen ermittelten IC₅₀-Werte und berechneten Standardfehler aller HS02-Aptamer-Varianten aufgeführt.

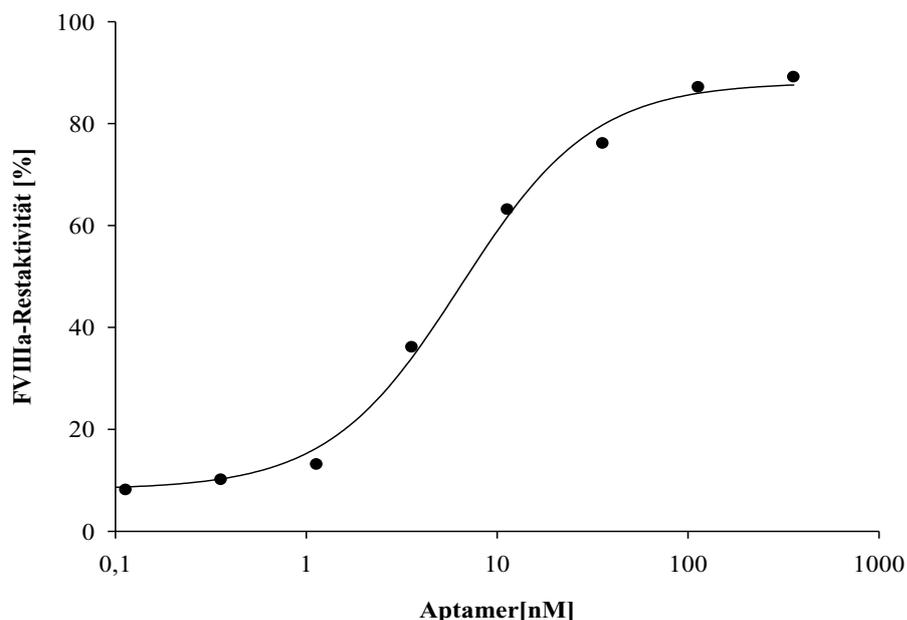


Abb. 17: Einfluss der HS02-88-Konzentrationen auf die APC-abhängige FVIIIa-Aktivität. Dargestellt sind die relativen FVIIIa-Restaktivitäten des Präparates Recombinate sowie die Regressionskurve (4-Parameter-Logistik-Funktion) zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes.

Tab. 9: IC_{50} -Werte und Standardabweichungen der HS02-Aptamer-Varianten und des D1-Pools.

| Aptamer | IC_{50} [nM] | $\pm s$ | Aptamer | IC_{50} [nM] | $\pm s$ |
|-----------|----------------|---------|--------------|----------------|---------|
| HS02-88 | 6,43 | 0,76 | HS02-44 G | 1,79 | 0,18 |
| HS02-73 | 8,24 | 1,31 | HS02-44 G-CT | 10,71 | 3,28 |
| HS02-63 | 4,60 | 1,30 | HS02-40 | 35,88 | 8,29 |
| HS02-62 | 1,73 | 0,54 | HS02-38 | 32,03 | 4,32 |
| HS02-52 | 4,90 | 0,18 | HS02-36 | 87,54 | 47,91 |
| HS02-52 G | 0,42 | 0,20 | HS02-32 | > 160 | - |
| HS02-48 G | 2,08 | 0,69 | D1 | - | - |

Die in Tabelle 9 aufgeführten IC_{50} -Werte zeigen, dass ab einer Verkürzung der Originalsequenz von 88 auf 40 Basen, ein Verlust der APC-Inaktivierungseffizienz zu verzeichnen ist. Ebenfalls führt die Entfernung des CT-Überhangs (Variante HS02-44 G-CT) zu einer verminderten Effizienz.

Aufgrund der vorstehend aufgeführten Ergebnisse wurde die Variante HS02-44 G als das Minimalmotiv der APC-Aptamere bezüglich der Inaktivierung von FVIIIa definiert.

4.7.5. Überprüfung des Einflusses der HSO2-Varianten auf die Aktivität des Tenase-Komplexes

Zur Überprüfung des Einflusses der HSO2-Varianten auf die Aktivitäten von Serinproteasen und FVIIIa im Tenase-Komplex wurde, wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben, in jedem der Aptamer-Versuche ein APC-freier Kontrollwert hergestellt. Diese Proben enthielten die höchste der eingesetzten Aptamer-Konzentrationen von 360 nM.

Die erzielten Messwerte sind im nachfolgenden Balkendiagramm der Abbildung 19 dargestellt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse im Vergleich mit den entsprechenden Werten der jeweils parallel angefertigten APC- und Aptamer-freien FVIIIa-Verdünnungsreihen (100 % -Werte).

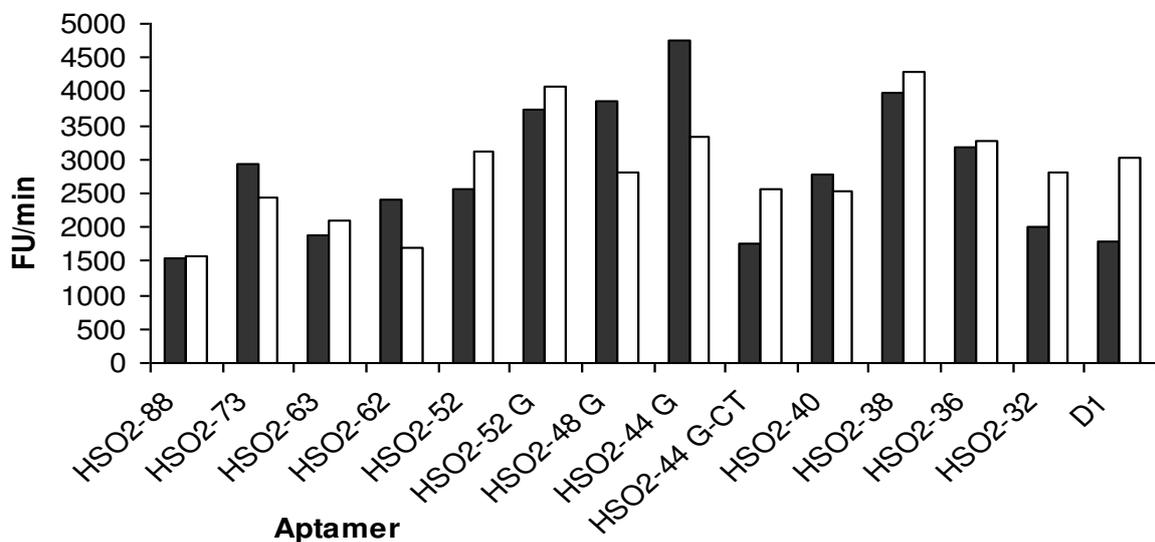


Abb. 18: Vergleich der FXa-Generierung in FU/min von APC-freien Kontrollwerten in Anwesenheit der aufgeführten HSO2-Varianten (•) mit den jeweiligen 100 % Werten der FVIIIa-Verdünnungsreihen (□).

Die vorstehende Abbildung zeigt, dass sich die FXa-Generierungen der APC-freien Kontrollen (Proben mit HSO2-Varianten) und der FVIII-Standardwerte (Proben ohne Aptamer) innerhalb der einzelnen Versuche nur unwesentlich voneinander unterschieden.

Die Ergebnisse lassen dementsprechend keinen Rückschluss darauf zu, dass durch die Aptamere die Mitglieder des intrinsischen Tenase-Komplexes in ihrer Aktivität wesentlich beeinflusst wurden.

4.7.6. Vergleichende kinetische Untersuchung des Einflusses von HS02-88 und HS02-44G auf die Faktor VIIIa-Inaktivierung

In einer vergleichenden kinetischen Untersuchung wurden die Wirkungen der Originalsequenz HS02-88 und der Minimalmotiv-Variante HS02-44 G auf die FVIIIa-Halbwertszeit bei der APC-vermittelten FVIIIa-Inaktivierung untersucht. Als Negativkontrolle wurde der unselektierte D1-Pool mitgeführt. Mit verwendeten Aptamer-Konzentrationen von 36 nM lagen die Aptamer-Kandidaten im 10-fachen molaren Überschuss zum eingesetzten APC vor.

Die arithmetischen Mittelwerte der in Doppelbestimmungen erzielten Messwerte sind in Abbildung 19 dargestellt.

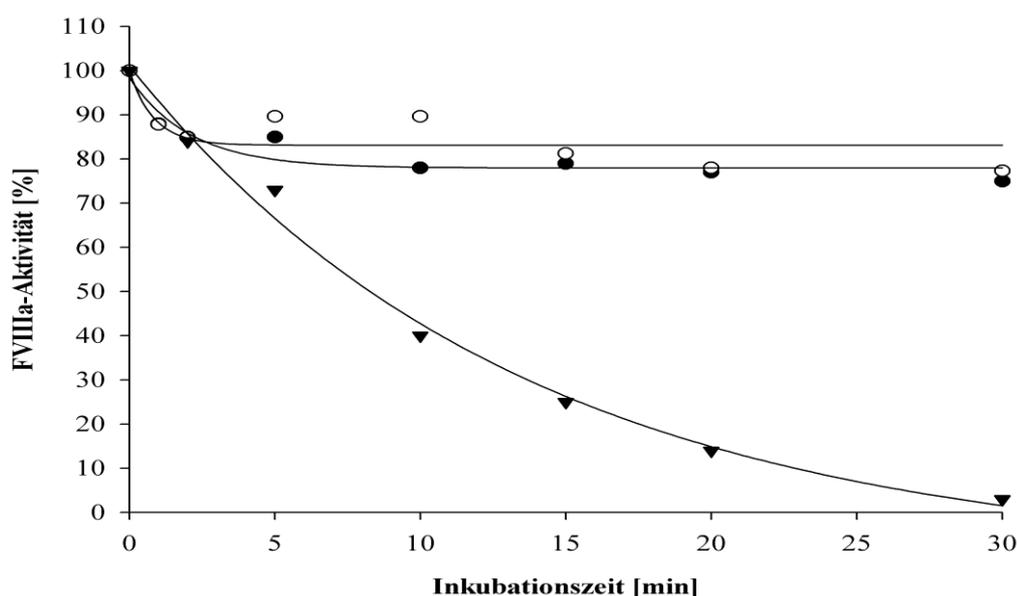


Abb. 19: Zeitabhängige APC-induzierte FVIIIa-Restaktivität [%] bei Einsatz der Aptamere HS02-88 (●), HS02-44 G (○) und des unselektierten D1-Pools (▼).

Aus der exponentiellen Interpolation ergab sich in Gegenwart des D1-Pools eine FVIIIa-Halbwertszeit von 8,3 Minuten.

Die Bestimmung der Halbwertszeiten von FVIIIa in Anwesenheit von HS02-88 und HS02-44G konnten mit Hilfe der angewendeten Interpolation nicht durchgeführt werden. Aus Abbildung 19 wird jedoch deutlich, dass bei einem 10-fachen molaren Überschuss der Aptamere die Halbwertszeiten sowohl bei der Aptamer-Originalsequenz, als auch bei der Minimalmotiv-Variante deutlich verlängert wurden. Diese lagen in einem Bereich, der den untersuchten Zeitraum von 30 Minuten deutlich übertrifft.

5. Diskussion

5.1. Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität der Faktor VIII-Präparate

Als erster Schritt wurde die Aktivität der zehn FVIII-Konzentrate überprüft. Hierfür wurden von allen Präparaten Proben mit 1 IU/ml hergestellt und anhand von zwei verschiedenen Messprinzipien bewertet. Dabei handelte es sich um die koagulometrische Erfassung der FVIII-Aktivität mittels einer aPTT-basierten Einstufen-Methode und um die amidolytische Bestimmung mit einem chromogenen Peptid-Substrat-Assay. Die koagulometrische Einstufen-Messung wurde zusätzlich in zwei verschiedenen Varianten durchgeführt und in zwei verschiedenen Koagulometern ausgewertet. In einem der beiden Einstufen-Tests wurde immunadsorbiertes FVIII-Mangelplasma der Firma Dade verwendet. Der zweite Einphasen-Test wurde nach einer im Institut etablierten in-house-Methode mit nativem Mangelplasma von Helena Laboratories durchgeführt. Die erzielten Messwerte ergaben folgende Feststellungen: (i) die einzelnen Präparate erreichen in den drei Messungen unterschiedliche Aktivitäten, besonders große Unterschiede bestehen bei plasmabasierten Konzentraten, (ii) mit Ausnahme von Octanate (Octapharma GmbH) werden in den koagulometrischen Messungen höhere FVIII-Aktivitätswerte gemessen als im chromogenen Test, deutlich ausgeprägt zeigte sich dieses Verhalten bei den Plasma-Präparaten, (iii) innerhalb jeder der drei Messungen waren zwei Gruppen zu erkennen: die Präparat-Gruppe der plasmabasierten Konzentrate erreicht in allen drei Messungen signifikant höhere Aktivitäten als die Gruppe der rekombinanten Konzentrate (Ausnahme Helixate Nex Gen im Einstufen-Clotting-Test mit nativem Mangelplasma).

Bei den festgestellten Diskrepanzen der Messwerte zwischen Einstufen-Methode und chromogenen Test spiegelt sich der Umstand wieder, dass die Bestimmung von FVIII ein seit langem bestehendes Problem darstellt (Lollar, 2003). Diese Thematik wurde in vielen Studien (Barrowcliffe et al., 1998; Lee et al., 1999; Raut et al., 2003) untersucht und bezieht sich sowohl auf die Messung von FVIII in Plasmaproben als auch in Gerinnungskonzentraten. Der Ausgangspunkt der Problematik liegt darin, dass FVIII als Pro-Kofaktor keine eigene definierbare proteolytische Wirkung besitzt. Der Gerinnungsfaktor kann nur indirekt nach erfolgter proteolytischer Spaltung aufgrund seiner Kofaktor-Aktivität bei der Generierung von FXa gemessen werden (Lundblad et al., 2000).

Erschwert wird die FVIII-Untersuchung durch die uneinheitliche Ausführung von unterschiedlichen Messmethoden, beziehungsweise deren mangelnden Standardisierung und der Vielfalt an Testreagenzien. Zusätzlich wirken sich die verschiedenen Reinheitsgrade und die verschiedenartigen Zusammensetzungen der einzelnen FVIII-Präparate erschwerend aus. Mit einer großen Vielgestaltigkeit der Reagenzien ist besonders die koagulometrische Einstufen-Methode behaftet (Barrowcliffe et al, 2002; Cinotti et al, 2006). Barrowcliffe et al. (2002) führen in ihrer Studie die Situation in Großbritannien auf, wo alleine 25 verschiedene aPTT-Reagenzien und 20 verschiedene FVIII-Mangelplasmen sowie 13 unterschiedlicher Referenz-Plasmen und 11 Untersuchungsgeräte zur Verfügung stehen.

Im Zusammenhang mit der bestehenden Problematik kann sich in den aufgeführten Versuchen als einer der verursachenden Gründe für die Aktivitätsunterschiede der Gebrauch eines Plasma-basierten Standards ausgewirkt haben. Dadurch wurde in den Untersuchungen das „like-versus like-Prinzip“ nicht eingehalten. Dieses Prinzip wird zur Verringerung von Messunterschieden zwischen Laboren und den verschiedenen Bestimmungsmethoden herangezogen. Dem Prinzip zufolge soll der zur FVIII-Bestimmung verwendete Referenzstandard aus dem gleichen FVIII-Material stammen wie die zu untersuchende Probe. Somit sollte entsprechend dem Testmaterial zwischen den koexistierenden Plasma- und Konzentrat-Standards gewählt werden (Lollar, 2003; UKHCDO, 2003). Durch produkt-spezifische FVIII-Standards konnten einige Studien zusätzlich die weitere Reduzierung von Messunterschieden erreichen (Ingerslev et al, 2004; Lee et al, 1999).

Allgemein gilt jedoch, dass Plasma-Standards von FVIII nicht zur Untersuchung von Gerinnungskonzentraten und Konzentrat-Standards nicht zur Messung von FVIII in Plasma-Proben geeignet sind (UKHCDO, 2003).

Ein anderer Faktor, der die in den Experimenten festgestellten Messunterschiede zwischen koagulometrischer und chromogener FVIII-Bestimmung bewirkt haben kann, ist die unterlassene Vorauflösung der Konzentrate in FVIII-Mangelplasma. Bei diesem Versuchsschritt handelt es sich um einen Bestandteil der Empfehlungen zur Standardisierung der Untersuchung von rekombinanten und hochgereinigten FVIII-Konzentraten. Diese Untersuchungsanweisungen wurden 1993 vom FVIII und FIX Subkomitee des Scientific and Standardization Committee (SSC) der internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (ISTH) erstellt (Barrowcliffe et al., 2002). Als Referenzmethode wurde darin der chromogene Test festgelegt (Hubbard et al., 2003).

Darüber hinaus wurden andere wesentliche Untersuchungsgrundsätze dieser Empfehlungen in den durchgeführten Experimenten angewendet. Dazu zählten die Verwendung von FVIII-Mangelplasmen mit einem normalen vWF-Gehalt sowie von Puffern, die einem Albumingehalt von einem Prozent aufweisen (Barrowcliffe et al., 2002). In einer Studie von Hubbard et al. (2002b) konnte gezeigt werden, dass bei Anwendung der oben aufgeführten SSC-Empfehlungen sowie einem Konzentrat-Standard, die Aktivitätsunterschiede von plasmabasierten und „full-length“ rekombinanten Präparaten zwischen Einphasen-Methode und chromogenen Test unter 10 Prozent gehalten werden konnte. Der Einfluss der Vorverdünnung mit Mangelplasma wirkt sich besonders empfindlich bei der Untersuchung von gentechnisch hergestellten FVIII-Präparaten aus. So weisen rekombinante Konzentrate bei Vorauflösung mit Puffer, im Vergleich zur Auflösung in Mangelplasma, eine um 16-20 % verringerte Aktivität auf. Für Plasma-VIII-Präparate liegt der Einfluss unter 5 % (Raut et al, 2003). Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Aspekt beim Zustandekommen der niedrigeren Aktivitäten von gentechnisch hergestellten Gerinnungskonzentraten mitgewirkt hat. Unabhängig von der Substanz zur Auflösung der Präparate wird, aufgrund von geringeren Messwerten mit immunadsorbiertem FVIII-Mangelplasma, im koagulometrischen Einstufen-Test der Gebrauch von nativem Substratplasma empfohlen (Barrowcliffe et al., 1993).

Wie bereits angeführt, erlauben die gemessenen Ergebnisse die folgenden zwei Feststellungen. Zum einen erreichten plasmabasierte FVIII-Präparate signifikant höhere Aktivitäten als rekombinante Konzentrate (t-Test, $p < 0,05$). Zum anderen erzielten alle beiden Präparat-Gruppen in der koagulometrischen Einstufen-Messung höhere Bestimmungswerte als im chromogenen Test. Plasmabasierte Präparate sowie Helixate Nex Gen (im geringeren Maße auch Kogenate) besaßen zudem noch deutliche Aktivitätsunterschiede zwischen beiden Einstufenmethoden. Dabei überstiegen die Messwerte mit nativem Mangelplasma die entsprechenden Ergebnisse mit immunadsorbiertem Substratplasma um 71-101 % (MW = 88 ± 10), bei Helixate Nex Gen sogar um 138 %. Die Aktivitätsunterschiede der übrigen drei rekombinanten Gerinnungsprodukte waren im Verhältnis nur gering ausgebildet.

Als weitere beeinflussende Komponenten auf die gemessenen Präparat-Aktivitäten können sich Bestandteile und Zusammensetzung der Konzentrate und Reagenzien sowie die Beschaffenheit des FVIII ausgewirkt haben. Bereits die chemischen Eigenschaften der verwendeten Puffer können sich unterscheiden und dadurch Reaktionen bei der FVIII-Untersuchung stören (Cinotti et al., 2006). Auch molekulare Unterschiede von FVIII sind als Ursache der Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Präparat-Gruppen nicht auszuschließen. Aus Plasma gereinigter FVIII stellt infolge von variablen proteolytischen Spaltungen an Positionen innerhalb der B-Domäne eine uneinheitliche Population von heterodimeren Komplexen dar. Diese bestehen aus der leichten und der schweren Kette. In der leichten Kette besitzen die A3-C1-C2-Domänen eine molekulare Masse von 80 kDa. Die schwere Kette umfasst die A1-A2-B-Domänen. Die B-Domäne kann aufgrund der Proteolysen vollständig, verkleinert oder fehlend sein. Dies führt zu unterschiedlichen molekularen Gewichten der schweren Kette von 90 bis 180 kDa (Vlot et al, 1998). Dadurch ist die Herstellung von identischen plasmabasierten und rekombinanten FVIII-Produkten nicht möglich (Khrenov et al, 2006). In der Arbeit unterschied sich das B-Domäne-deletierte FVIII-Präparat Refacto (Wyeth) von den übrigen Konzentraten dahingehend, dass es in den Messungen mit immunadsorbiertem Mangelplasma und chromogenen Peptidsubstrat die niedrigsten Messwerte aller rekombinanten und plasmatischen Gerinnungspräparate zeigte. Dabei war die Aktivität im chromogenen Zwei-Stufen-Test besonders gering. Diese war um 52 % niedriger als im Einstufen-Test mit nativem Mangelplasma. Im Vergleich zur Einstufen-Messung mit immunadsorbiertem FVIII-Mangelplasma zeigte sich die Aktivität von diesem Präparat im chromogenen Test um 35 % geringer. Damit verhielt sich die Refacto-Probe entgegengesetzt zu bisherigen Untersuchungen, in denen nach der Predilution mit nativem Mangelplasma gemessen wurde. Dort ergaben Einstufen-Tests mit kommerziellen aPTT-Reagenzien etwa 50 % niedrigere Aktivitäten als im chromogenen Substrat-Assay. Zurückgeführt wurde dies auf eine größere Empfindlichkeit des BDD-rFVIII bezüglich Ursprung und Konzentration der Phospholipide bzw. deren unphysiologischen Charakter in aPTT-Reagenzien (Mikaelsson et al., 1998; Sandberg et al., 2001).

Einen Einfluss der Aktivierungszeit auf das festgestellte niedrige Messergebnis von Refacto im chromogenen Substrat-Test kann nicht ausgeschlossen werden. Eine Studie von Hubbard

et al. (2002a) konnte bei Verlängerung der Aktivierungszeit von zwei bis hin zu 15 Minuten eine Erhöhung der Aktivität von Refacto im chromogenen Assay um 34 % erzielen. Für das vergleichend untersuchte plasmabasierte Method-M-Präparat ergab die Überprüfung keine Veränderung der FVIII-Aktivität. Bei dem in der Studie verwendeten Test-Kit handelte es sich allerdings im Gegensatz zum verwendeten Assay dieser Arbeit um einen thrombin-freien chromogenen Test. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass sich eine Ausweitung der Aktivierungszeit für die FVIII-Bestimmung von Refacto weniger deutlich auswirken würde.

Weitere Ursachen für unterschiedliche Konzentrat-Aktivitäten können auf FVIII-Veränderungen beruhen, die sich im Rahmen des Herstellungsprozesses ereignen oder durch Zusatzstoffe ausgelöst werden. Beispielsweise wurde im Rahmen einer Untersuchung zur Immunogenität von FVIII-Präparaten Veränderungen der dreidimensionalen Struktur der FVIII-Moleküle erwägt, die durch direkte Bindung von Zusätzen wie Albumin bedingt sind und als Folge unphysiologische FVIII-Formen auslösen können (Behrmann et al., 2002).

Andere Abweichungen zwischen rekombinanten und plasma-basierten Konzentraten, die die FVIII-Bestimmung beeinflusst haben können, bestehen aufgrund von posttranslationalen Modifikationen. Diese entstehen im Zytoplasma der synthetisierenden Zelle und bedingen andersartige Nicht-Aminosäuren-Bestandteile wie Zucker-, Phosphat- und Sulfatgruppen (Meili, 2004).

Die erhaltenen Messwerte deuten darauf hin, dass pbFVIII-Präparate einen oder mehrere Bestandteile aufweisen, die zur Bildung von höheren Aktivitäten führen. In Betracht gezogen werden können hierfür in erster Linie aktivierter FVIII und/oder vWF. Diese beiden Blutbestandteile werden auch in einer Untersuchung von Kemball-Cook et al. (1993) als Ursache für unterschiedliche Konzentrat-Aktivitäten in Betracht gezogen. Die dort ermittelten Ergebnisse und deren Deutungen stehen allerdings in Widerspruch zu den in der Arbeit erzielten Resultaten. So wird in der betreffenden Studie von Kemball-Cook das Vorhandensein von aktiviertem FVIII in Gerinnungspräparaten zwar als Ursache von schnellerer FXa-Bildung und höheren Bestimmungswerten im Einstufen-Test vermutet, allerdings galt dies in erster Linie für hochgereinigte FVIII-Produkte (rFVIII-Präparate sowie pbFVIII-Konzentrate, die durch Affinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern gereinigt wurden). Demgegenüber erzielten vier von sechs getesteten plasmabasierten Präparaten mit mittlerem Reinheitsgrad in den angesprochenen Bereichen schlechtere Resultate. In Erwägung ziehen Kemball-Cook et al. auch, dass die festgestellten Unterschiede in Zusammenhang mit vorhandenem vWF in den mittelgrad gerinigten pbFVIII-Präparaten stehen.

Von den in dieser Arbeit eingesetzten Gerinnungskonzentraten enthalten laut Angabe der Internet-Version der Roten Liste alle plasmabasierten FVIII-Präparate mit Ausnahme von Beriate P (ZLB Behring) vWF (Barthels und Schramm, 2004). Angesichts der Tatsache, dass die entsprechenden Konzentrate sowie Beriate P in allen Messungen höchste Ergebnisse erzielen, ist nicht von einer verringerten FVIII-Aktivität aufgrund von vWF auszugehen. Da außerdem der Gehalt einer kleinen Menge an vWF für Beriate P angegeben wird (Tagariello

et al., 2007), scheint vorhandener vWF in FVIII-Präparaten vielmehr eine aktivitätsfördernde Wirkung auf FVIII auszuüben. Festgestellt wurde bereits eine Auswirkung des vWF-Gehaltes von Mangelplasmen auf die Untersuchung von rekombinanten und hochgereinigten FVIII-Konzentraten in der Einstufen-Methode. FVIII-Mangelplasmen mit abgereichertem vWF-Gehalt erbringen für diese Präparate niedrigere Aktivitäten. Aus diesem Grund wurde in die SSC-Empfehlungen der Gebrauch von Mangelplasmen mit normalem vWF festgesetzt (Barrowcliffe et al., 2002). Auf mögliche Zusammenhänge zwischen vWF und der Aktivierung von FVIII wird im nachfolgenden Kapitel 5.1.2. ausführlicher eingegangen.

Die höheren Aktivitäten von plasmabasierten FVIII-Konzentraten in allen durchgeführten Messungen sprechen des Weiteren für das Vorliegen von FVIIIa in diesen Präparaten.

Dem aPTT-basierten Einstufen-Test wird eine hohe Sensivität für voraktivierte Gerinnungsfaktoren und dadurch bedingter Überbewertung der FVIII-Aktivität zugesprochen (Rosen und Casoni, 2002). Diese Eigenschaft des Testsystems kann zudem zu den erheblich höheren Messwerten der plasmabasierten FVIII-Produkte in der koagulometrischen Bestimmung geführt haben.

Als alleinige Ursache für die höheren Bestimmungswerte ist dies allerdings nicht anzunehmen. Dafür sind die Aktivitäten der Gruppe der plasmabasierten FVIII-Konzentrate innerhalb der Messmethoden zu einheitlich ausgebildet.

Neben geringen Mengen an aktiven FVIII in den Präparaten können auch Spuren des Gerinnungsfaktors in den Mangelplasmen enthalten sein (Lundblad et al., 2000). Auch dadurch könnten höhere Bestimmungswerte in Einstufengerinnungs-Test verursacht werden. Nach Information der Hersteller Dade Behring und Helena Laboratories beinhalten sowohl durch Immunadsorption depletiertes als auch natives Mangelplasma weniger als 1 Prozent FVIII-Aktivität. Allerdings können bereits kleinste, aktivierte Mengen dieser Proteine die gemessene FVIII-Aktivität im Test beeinflussen. Dieser Effekt sollte sich allerdings gleichermaßen auf plasmabasierte und rekombinante Produkte auswirken.

Innerhalb der beiden koagulometrischen Bestimmungen der Plasma-Präparate ergaben sich in der Untersuchung mit nativem Mangelplasma deutlich höhere Ergebniswerte. Die Aktivitäten unterschieden sich dabei um 71-101 Prozent ($MW = 88 \pm 10$). Da auch das gentechnisch hergestellte Gerinnungskonzentrat Helixate Nex Gen (Bayer) und im geringem Maße auch Kogenate (Bayer) dieses Ergebnis aufzeigten, müssen für dieses Verhalten außerdem Faktoren von Bedeutung sein, die im Herstellungsprozess der entsprechenden Präparate zu finden sind.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei Helixate Nex Gen und Kogenate um identische Konzentrate handelt (UKHCDO, 2003), die unter verschiedenen Präparatnamen vertrieben werden, müssen auch Messschwankungen bei der Durchführung der Bestimmung der FVIII-Aktivität für das Zustandekommen dieser Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

Die Phospholipide der aPTT-Reagenzien können die Variabilität der Einstufen-Messung maßgeblich beeinflussen (Mikaelsson et al., 1998). Möglicherweise sind diese ein Grund für die erhaltenen Messunterschiede zwischen den beiden koagulometrischen FVIII-

Bestimmungen. In der Einstufen-Methode, deren Durchführung nach einer in-house-Methode mit nativem Mangelplasma erfolgt, wird kein kommerzielles aPTT-Reagenz eingesetzt. Die Phospholipid-Quelle stammt in diesem Test aus Lipoid, welches im Institut aus Kaninchenhirn hergestellt wurde.

Die geringeren Aktivitäten im chromogenen Peptid-Substrat-Assay können möglicherweise dadurch bedingt worden sein, dass die Auflösung des FIXa und des FX-Reagenzes sowie die Mischung des Stopp-Puffers abweichend der angegebenen Versuchsdurchführung des Herstellers Dade Behring erfolgte. Anstatt dessen wurde entsprechend der etablierten Testdurchführung der Hämophilie-Abteilung des Instituts vorgegangen. Unter Umständen führte dies zu einem ungünstigen bzw. nicht optimalen Verhältnis von FVIII und Thrombin.

5.2. Vergleichende Aktivierung der Faktor VIII-Präparate durch Thrombin

Überprüft wurde in der Versuchsreihe der konzentrationsabhängige Einfluss von Thrombin auf die FVIIIa-Generierung im Einstufen-Clotting-Test. Um die Verläufe der Thrombin-vermittelten Aktivierungen vergleichend beurteilen zu können, wurde jedes der FVIII-Produkte für die Aktivierungsreaktion auf 10 IU/ml adjustiert. Nach Beendigung der FVIII-Aktivierung durch die Zugabe von Hirudin, wurden zur anschließenden FVIIIa-Bestimmung alle Präparat-Proben auf 1 IU/ml eingestellt. Das eingesetzte Hirudin wies im Versuchsansatz eine Endkonzentration von 100 ng/ml auf. Diese Hirudinkonzentration zeigte in einem zuvor durchgeführten Vorversuch (Kapitel 4.2.1.) eine reduzierende Beeinflussung auf die Aktivität von 1 IU/ml FVIII (Chandler et al., 2003). Die Proben der FVIII-Präparate wurden zur Bestimmung der FVIII-Aktivität nach der Reaktion mit Thrombin allerdings 1:10 verdünnt, so dass die finale Hirudin-Konzentration auf 10 ng/ml reduziert wurde. Diese Konzentration zeigte keinen Einfluss auf das FVIII-Testergebnis.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Thrombin-Menge ermittelt, die mit der eingesetzten Hirudin-Konzentration von 100 ng/ml inaktiviert werden kann. Es wurde festgestellt, dass mit der Hirudin-Konzentration von 100 ng/ml Thrombin in einer Konzentration bis 2 IU/ml vollständig inaktiviert werden kann. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die in der Versuchsreihe maximal vorliegende finale Thrombin-Konzentration von 1 IU/ml, durch die Zugabe des Hirudins vollständig inaktiviert wurde.

Aus den gewonnenen Messwerten wurde ersichtlich, dass jedes der zehn Gerinnungspräparate durch Thrombin aktiviert wurde und die Aktivitätsbildung abhängig von der Thrombinkonzentration erfolgte. Bereits durch Einwirkung der geringsten eingesetzten Thrombinmenge stiegen die Aktivitäten aller Konzentrate an.

Durch Inkubation mit größeren Thrombin-Konzentrationen wurde in den durchgeführten Versuchen, nach Erreichen maximaler FVIII-Aktivität, bei allen FVIII-Präparaten eine verringerte FVIIIa-Bildung vermutlich infolge zusätzlicher proteolytischer Spaltung an Arg 336 ausgelöst (Fay et al., 1993; Pipe und Kaufman, 1997).

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge bestehen Unterschiede zwischen der Gruppe der plasmatischen und rekombinanten Konzentrate hinsichtlich der Höhe der Aktivitätsbildung und des Einflusses der Thrombinkonzentrationen auf FVIII/VIIIa.

Die festgestellten Aktivitätsunterschiede von plasmabasierten und rekombinanten Präparate waren statistisch signifikant (t-Test, $p < 0,01$). Plasmabasierte Konzentrate entwickelten deutlich höhere Aktivitäten mit einem maximalen Gesamtmittel an FVIII-Aktivität von 121 ± 29 %. Im Gegensatz dazu erreichten rFVIII-Präparate ein maximales Gesamtmittel von nur 53 ± 11 % Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von Hubbard et al. (2002a). Dort ergab eine kinetische Untersuchung der thrombin-vermittelten FVIII-Aktivierung höhere Aktivierungen eines rekombinanten B-Domänen-deletierten Konzentrates im Vergleich zu einem plasmabasierten Method-M-Produkt. Aus Plasma gewonnene Method-M-FVIII-Präparate sind im Rahmen ihres Herstellungsprozesses durch Immunoaffinitätschromatographie mit murinen monoklonalen Antikörpern gereinigt. Entsprechende plasmabasierte FVIII-Konzentrate wurden in dieser Arbeit nicht eingesetzt.

Die Zugabe von verschiedenen Thrombinkonzentrationen ermöglichte die Beurteilung der Thrombin-Sensitivitäten der einzelnen Produkte. Plasmabasierte FVIII-Konzentrate erzeugten Aktivitätsmaxima bei durchschnittlich 0,12 IU/ml Thrombin (als Ausnahme bildete Octanate seine höchste Aktivität schon mit 0,03 IU/ml Thrombin). Bei rekombinanten Gerinnungskonzentraten liegen die Bereiche maximaler Aktivität zwar deutlich unter den Ergebnissen der plasmatischen Präparate, erreichen aber andererseits diese im Durchschnitt bereits mit 0,03 IU/ml (Helixate Nex Gen schon mit 0,02 IU/ml).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich eine größere Thrombin-Sensitivität der rekombinanten FVIII Präparate vermuten, in deren Folge die Aktivierbarkeit erleichtert ist. Bisher liegen in einigen Studien lediglich Annahmen für eine größere Sensitivität der thrombin-vermittelten Spaltung eines rekombinanten B-Domänen deletierten FVIII-Proteins vor (Eaton et al., 1986b; Pittman et al., 1993). Im Gegensatz hierzu zeigt eine jüngere Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der FVIII-Aktivierung mit zwei verschiedenen Thrombinkonzentrationen, vergleichbare Aktivierungsprofile eines BDD-rFVIII und eines plasmatischen FVIII mit unterschiedlich großen B-Domänen (Sandberg et al., 2001).

Es ist vorstellbar, dass eine größere Thrombin-Sensitivität von FVIII-Proteinen bestimmter FVIII-Präparate im Organismus eines Hämophilie A-Patienten dazu führt, dass diese effizienter durch Thrombin aktiviert werden. Möglicherweise könnte dadurch die Normalisierung der Hämostase durch eine geringere FVIII-Menge erzielt werden. Die zu substituierende FVIII-Dosis könnte daher verringert werden.

Zur Überprüfung der erzielten Resultate wurden die Versuche zur Untersuchung der Thrombin-vermittelten FVIII-Aktivierung wiederholt und die Aktivität mithilfe eines andersartigen Messprinzips ausgewertet. Die dazu herangezogene fluorimetrische Bestimmung der FVIIIa-vermittelten FXa-Generierung bestätigte die zuvor gefundene Feststellung, dass plasmabasierte Präparate unter der Einwirkung von Thrombin höhere Aktivitäten erzielen. Die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Konzentrat-Gruppen

waren erneut statistisch signifikant (t-Test, $p < 0,02$). Die FVIIIa-Bildung der Plasma-Konzentrate entwickelte allerdings einen andersartigen Aktivitätsverlauf. Diese Präparate erzeugten mit steigender Thrombinkonzentration Aktivitätsplateaus, die sich über einen Konzentrationsbereich von 0,03-0,12 IU/ml Thrombin erstreckten. Wahrscheinlich liegt die Ursache für die andersartige Aktivitätsbildung der beiden Untersuchungsmethoden in den unterschiedlichen Konzentrationen der beteiligten Komponenten des Tenasekomplexes. Auch die längere Messdauer der fluorimetrischen Bestimmung, in der eine anhaltende FXa-vermittelte FVIII-Aktivierung durch Rückkopplungsreaktionen möglich ist, kann sich ausgewirkt haben. Insgesamt entwickelten alle untersuchten FVIII-Konzentrate höchste Aktivitäten im Bereich von 0,02-0,06 IU/ml Thrombin und pbFVIII-Präparate auch bei einer Konzentration von 0,12 IU/ml Thrombin. Dabei ist die Tendenz zu erkennen, dass gentechnisch hergestellte Präparate Aktivitäts-Maxima zwischen 0,03-0,06 IU/ml und Plasma-Konzentrate bei 0,03-0,12 IU/ml bilden.

Das unterschiedliche Verhalten von plasmabasierten und rekombinatem FVIII bei der Aktivierung durch Thrombin kann aufgrund von Abweichungen auf molekularer Ebene basieren. Hubbard et al. (2002a) vermuteten als Ursache von ungleichen thrombin-induzierten Aktivitätsbildungen eines BDD-r-Faktor VIII und eines plasmabasierten Method-M Präparates molekulare Unterschiede von FVIII, welche auf Reinigungs- und Herstellungsprozesse beruhen und ein unterschiedliches Profil bei der Aktivierung durch Thrombin bewirken. Eine Studie von Raut et al. (1998) ergab Modifikation von FVIII nach einer Kombination aus Solvent-Detergent-Verfahren und Pasteurisations-Behandlung. Entsprechender FVIII zeigte veränderte Aktivitäten hinsichtlich einer verlangsamten Proteolyse der leichten Kette durch Thrombin, schnellerer FXa-Bildung und erhöhter Phospholipidaffinität und Phospholipidbindung. In dieser Arbeit wurden allerdings keine FVIII-Präparate verwendet, die im Rahmen ihrer Herstellung eine Kombination aus diesen beiden Prozessen durchlaufen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen unterschiedlichen FVIII-Aktivitäten und vWF-Gehalt der plasmabasierten und rekombinanten Präparate wurde bereits in Kapitel 5.1.1. angesprochen. Dem vWF wird eine Kofaktor-Funktion bei der Proteolyse der Aminosäureposition 1689 zugeschrieben (Hill-Eubanks und Lollar, 1990). Die Effektivität dieser Spaltung kann dadurch bis zu 8-fach erhöht sein (Saenko et al., 1999). Hierdurch ist die Entstehung von höheren FVIII-Aktivitäten der Plasma-Konzentrate denkbar. Andererseits ist weiterhin bekannt, dass in Abwesenheit von vWF eine ausreichende FVIII-Aktivierung ohne Spaltung an Position Arg 1689 gebildet wird (Hill-Eubanks et al., 1989; Regan und Fay, 1994). Aufgrund dessen ist es vorstellbar, dass vWF-freie rFVIII-Präparate zur Bildung maximaler Aktivität geringere Thrombinkonzentrationen benötigen.

Als weiterer Versuchsschritt der Arbeit wurde überprüft, ob durch etwaige Inhaltsstoffe der plasmabasierten Gerinnungskonzentrate eine Beeinflussung der Thrombin-Aktivität bei der FVIII Aktivierung bewirkt wird. Hierfür wurden verschiedene Gehalte eines rekombinanten

(Kogenate, Bayer) und eines plasmabasierten (Haemate HS, ZLB Behring) FVIII-Konzentrates mit den in den Aktivierungs-Versuchen verwendeten Thrombin-Konzentrationen inkubiert. Von Haemate HS wurden 10, 5 und 2,5 IU/ml und von Recombinate 10, 20 und 40 IU/ml eingesetzt. Die resultierenden Aktivitäten wurden im Einstufen-Clottingtest bestimmt.

Die Untersuchung zeigte, dass auch ein reduzierter Gehalt von pbFVIII zur maximalen Aktivitätsbildung mehr Thrombin (0,03-0,06 IU/ml) benötigt als eine größere Menge an rekombinant hergestelltem FVIII. Rekombinanter FVIII erreicht trotz ansteigender FVIII-Menge bereits ab der geringsten Thrombinkonzentration (0,02 IU/ml) seine größte Aktivität.

Es war die Tendenz zu erkennen, dass bei einer abnehmenden Menge von Plasma-FVIII auch weniger Thrombin zur maximalen Aktivierung benötigt wird. Diese Ergebnisse ließen somit nicht ausschließen, dass plasmabasierte FVIII-Produkte Inhaltsstoffe beinhalten, welche die Aktivität von Thrombin hemmend beeinflussen.

Im Rahmen einer weitergehenden Untersuchung zum Nachweis von Thrombin-inhibierenden Einheiten in pbFVIII-Präparaten, wurde anhand des ausgewählten Beispiel-Inhibitors Hirudin (Refludan®), die Inaktivierung von Thrombin in einem fluorogenen Substrat-Assay überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine finale Thrombin-Konzentration von 0,6 IU/ml Thrombin (4,5 nM) mit unterschiedlichen Hirudin-Mengen inkubiert.

Die vollständige Thrombin-Inaktivierung wurde bei einem molaren Verhältnis von 1:1 festgestellt. Erkennbar wurde ein hemmender Effekt auf die Aktivität von 4,5 nM Thrombin ab einer Konzentration von 0,3 nM Hirudin (Abb. 11).

Diesen Ergebnissen zufolge ist mit dem angewendeten fluorogenen Test ein potenter Thrombin-Inaktivator nachweisbar, der mindestens über ein fünfzehntel der Stoffmengenkonzentration von Thrombin verfügt.

Bei Übertragung dieses Ergebnisses auf die Versuchsreihe zur Thrombin-vermittelten Aktivierung von FVIII-Konzentraten (Kapitel 4.2.) wird belegt, dass jede der eingesetzten Thrombin-Konzentrationen durch die vorliegende Hirudinmenge vollständig inaktiviert wurde. Das eingesetzte Hirudin (14,4 nM) lag in einem 1,9-fachen molaren Überschuss zur maximal vorliegenden Thrombin-Endkonzentration von 7,5 nM (1 IU/ml) vor. Somit ist das Ergebnis des Vorversuchs zur Überprüfung des Einflusses von Hirudin auf die Aktivität von Thrombin (Kapitel 4.2.2.) bestätigt.

Nachdem der Nachweis eines Thrombin-Inhibitors im fluorogenen Substrat-Assay dargestellt wurde, konnte anschließend in einem auf diesem Versuchsprinzip basierenden Thrombin-Neutralisationstest der Einfluss von 10 IU/ml FVIII-Präparat auf die Aktivität von Thrombin überprüft werden.

Die Versuche ergaben keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Aktivität von 0,6 IU/ml (4,5 nM) bzw. 0,3 IU/ml (2,25 nM) Thrombin durch FVIII-Präparate. Aufgrund der zuvor erhaltenen Feststellung, müssten durch diesen Versuch zumindest thrombin-inhibierende Einheiten hoher Potenz in den FVIII-Präparaten ab einer Stoffmengenkonzentration von 0,3

nM bzw. 0,15 nM nachweisbar sein. Beziehungsweise unter Einbeziehung der stattfindenden Verdünnungen während der Messung ab einer Stoffmengenkonzentration 0,1 nM bzw. 0,05 nM.

Berücksichtigt werden muss, dass der durchgeführte Nachweis eines Thrombin-Inhibitors auf Untersuchungen mit Hirudin basiert. Hirudin wurde ursprünglich aus den Blutegeln *Hirudo medicinalis* isoliert und gilt als stärkster Inhibitor von Thrombin (Adams et al., 2003; Greinacher et al., 1999). Heute liegen zur Hirudin-Herstellung rekombinante Technologien vor (Nowak und Schrör, 2007). Thrombin-Antagonisten mit einer geringeren Wirksamkeit als Hirudin sind durch das Testprinzip nicht aufgezeigt worden. Das Vorhandensein von kleinen Mengen an schwächer wirksamen Thrombinhemmstoffen in plasmabasierten Gerinnungskonzentraten ist aufgrund dessen nicht auszuschließen. Schlussfolgernd kann bezüglich der Aktivierung von FVIII-Präparaten nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Aktivität von Thrombin durch Verunreinigungen mit thrombin-inhibierenden Einheiten hemmend beeinflusst wird. Als solche können vor allem die Serpine Antithrombin III, Heparin Cofaktor II und die Protease Nexin I in Betracht gezogen werden (Myles et al., 1998; Pike et al., 2005).

5.3. Vergleichende Inaktivierung der Faktor VIII-Präparate durch APC

Zur vergleichenden Untersuchung der proteolytischen APC-Aktivität bei der FVIIIa-Spaltung verschiedener FVIII-Präparationen erfolgte die Untersuchung der Inaktivierung aller zehn aktivierter FVIII-Präparate durch APC. Hierzu wurde deren verbleibende Kofaktor-Aktivität nach Inkubation mit einer seriellen APC-Verdünnungsserie durch die Umsetzung eines fluorogenen FXa-Substrates bestimmt. Das Mitführen von parallel angefertigten APC-freien FVIIIa-Verdünnungsreihen in den einzelnen Versuchsdurchläufen diente der Kontrolle der FVIII-Aktivitäten, die von den entsprechenden FVIII-Präparaten nach Vorinkubation mit Thrombin ausgebildet wurden und anschließend im Inaktivierungsversuch mit APC vorlagen. Die Experimente ergaben für alle FVIII-Präparate vergleichbare Profile einer von der APC-Konzentration abhängigen Inaktivierung (Abb.13). Ein solches Verhalten stimmt mit den Ergebnissen einer kinetischen Untersuchung der FVIII-Inaktivierung von Sandberg et al. (2001) überein, in der die FVIIIa-Inaktivierung eines Plasma- und eines BDD-rFVIII-Konzentrates durch Einstufen-Gerinnungsmessung vergleichend überprüft wurde.

Mittels entsprechender Software konnten für die einzelnen FVIII-Konzentrate die entsprechenden IC_{50} -Werte berechnet werden. Der IC_{50} -Wert bezeichnet hierbei diejenige APC-Konzentration, bei der die FVIIIa-Aktivität um 50 % vermindert ist. Er stellt ein Maß für die APC-Empfindlichkeit der FVIIIa-Moleküle dar. Die erhaltenen IC_{50} -Werte (Tab.7) verteilten sich im nanomolaren Bereich von 0,81-1,99 nM APC. Grundlegende Unterschiede der IC_{50} -Werte zwischen der Gruppe der plasmabasierten und rekombinanten FVIII-Präparate wurden nicht aufgezeigt, die ermittelten Werte liegen nahe beieinander. Im Gegensatz zu diesen Resultaten zeigten Khrenov et al. (2006) unterschiedliche Empfindlichkeiten eines BDD-rFVIII-Präparat hinsichtlich seiner proteolytischer Inaktivierung durch APC und FXa.

Die Studie verglich mittels kinetischer Untersuchung ein BDD-rFVIII-Präparat (Refacto) mit einem „full-length“ rekombinanten und einem plasmatischen Konzentrat. Die Experimente ermittelten eine größere Empfindlichkeit von Refacto bezüglich der APC und FXa-vermittelten Inaktivierung, die sich in einer schnelleren proteolytischen Inaktivierung begründete und zu einer höheren Inaktivierungsrate führte. Die Forschergruppe zieht die Möglichkeit in Betracht, dass die proteolytische Inaktivierung von FVIII-Molekülen mit vollständig ausgebildeter B-Domäne, durch die nicht vollständige Entfernung dieser Domäne im Zuge der Aktivierungsreaktion, beeinflusst wird.

Die im Vergleich zur Studie von Khrenov et al. (2006) nicht übereinstimmende Versuchsaussage zur APC-Empfindlichkeit der verschiedenen FVIII-Varianten ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Untersuchungen anhand verschiedener Parameter durchgeführt wurden. So handelte es sich bei den Experimenten dieser Arbeit um eine konzentrationsabhängige Versuchsreihe anhand von unterschiedlichen APC-Konzentrationen. Die Studie von Khrenov et al. (2006) basiert hingegen auf die zeitabhängige Überprüfung der FVIIIa-Inaktivierung.

Die festgestellten ähnlichen APC-Sensitivitäten und die gleichförmigen Kurvenverläufe der konzentrationsabhängigen APC-induzierten FVIIIa-Inaktivierung sprechen dafür, dass der proteolytische Abbau dieser zehn FVIII-Präparate im Organsimus einheitlich erfolgt.

Demgegenüber könnten höhere Empfindlichkeiten einzelner FVIII-Präparate zur Inaktivierung durch APC bei Hämophilie A-Patienten zu einem schnellerem Abbau von FVIIIa führen. Daraus würde voraussichtlich ein höherer Bedarf an zu appliziertem FVIII resultieren.

Insgesamt kann aufgrund der in der Arbeit erhaltenen Ergebnissen den untersuchten zehn FVIII-Präparaten eine vergleichbare APC-Sensitivität zugesprochen werden. Ein Effekt verschiedener FVIII-Präparate auf die proteolytische APC-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Bezüglich der Thrombin-vermittelten Aktivierung wurden hingegen unterschiedliche Sensitivitäten von plasmabasierten und rekombinanten Konzentraten vermutet.

5.4. Beeinflussung der proteolytischen Aktivität von APC bei der Inaktivierung von Faktor VIIIa durch das APC-DNA-Aptamer HS02

Die antikoagulatorische Aktivität von APC umfasst die proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren FVa und FVIIIa. Gegenstand des letzten Abschnitts dieser Dissertationsarbeit war die funktionelle Charakterisierung des APC-DNA-Aptamers HS02 bezüglich seines Einflusses auf die APC-induzierte proteolytische Inaktivierung von FVIIIa. Die Grundlage hierfür bildeten DNA-Aptamere, welche in der Arbeitsgruppe Pötzsch/Müller/Mayer gegen rekombinantes APC (Drotrecogin Alpha, Xigris®) selektiert wurden. Die Untersuchung der Bindungseigenschaften von vier gewonnenen Monoklonen (HS02, HS03, HS04, HS08) ergab Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich weshalb jedem dieser Aptamersequenzen eine hohe Affinität zu APC zugeschrieben werden

konnte. Für diese Dissertation wurde das Aptamer HS02 ausgewählt, da es sich im Vergleich mit der besten APC-Bindungsaffinität auszeichnete. Sofern die HS02-Originalsequenz (HS02-88) einen Effekt auf die APC-vermittelte FVIIIa-Inaktivierung zeigt, sollte als weiteres Untersuchungsziel anhand der von der Arbeitsgruppe hergestellten HS02-Varianten ein minimales Bindungsmotiv des DNA-Moleküls ermittelt werden. Die HS02-Varianten wurden durch Molekülverkürzung sowie durch Molekülmodifikationen aus der 88 Basen bestehenden HS02-Originalsequenz generiert. Berücksichtigt wurde bei der Entwicklung der verschiedenen HS02-Varianten der Erhalt der Stem-Loop-Struktur, die eine 14-Basen lange Konsensussequenz enthält. Konsensussequenzen, deren Anordnung in Stem-Loop-Strukturen häufig ist, werden für die Bindungsspezifität von selektierten Aptameren verantwortlich gemacht (Ulrich et al., 2004). Die im HS02-Aptamer enthaltene Konsensussequenz wurde im dem vorausgegangenem Forschungsprojekt innerhalb der klonierten Monoklone (HS02, HS04, HS08 und HS02) erkannt (Kapitel 2.6.2., Abb.5).

Die Bestimmung eines minimalen Bindungsmotives diene in erster Linie der Aufklärung von essentiellen Bindungsstrukturen für die Bindung an das Target-Molekül. Andererseits kommt der Bestimmung von Minimalmotiven in der Analyse von Aptameren noch weitere Bedeutung zu. So ist mit einer Aptamer-Verkürzung eine Erhöhung der Aptamer-Spezifität und eine Senkung von Herstellungskosten verbunden (Kulbachinskyiy, 2007). Im Zusammenhang mit den Herstellungskosten wirkt sich dabei auch aus, dass bei der Synthese von kürzeren Oligonukleotiden die anfallende Menge an Kettenabbruchprodukten verringert ist und dadurch die Herstellungsproduktivität gesteigert wird.

Die Sekundärstrukturen der erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde von der Arbeitsgruppe unter Nutzung des im Internet frei verfügbaren Programm „mfold“ berechnet. Dieses Programm analysiert übermittelte Sequenzen anhand des Zuker-Algorithmus (Zuker, 2003). Bei dieser Analyse werden, unter Beachtung der bei der Faltung freiwerdenden Energie, verschiedene energetisch optimale Strukturvarianten ermittelt. Die in Abbildung 7 abgebildeten HS02-Varianten basieren auf der für die HS02-Originalsequenz berechneten thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen. Da bei der Bindung der Aptamere an APC gleichwohl auch energetisch ungünstigere Sekundärstrukturen möglich sind, repräsentieren die dargestellten Strukturen lediglich theoretische Strukturvorhersagen.

Bei jedem der einzelnen Aptamer-Versuche wurde die FXa-Generierung von einer APC-freien Kontrollprobe bestimmt, die jeweils die höchste Aptamer-Konzentration von 360 nM aufwies. Diese Messwerte wurden mit den entsprechenden Faktor VIIIa-Verdünnungsreihen verglichen (Abbildung 18). Hierdurch sollten Hinweise dafür gefunden werden, ob die Faktoren des Tenase-Komplexes durch die Anwesenheit der DNA-Moleküle in ihrer Aktivität beeinflusst sind. Die gemessenen Werte geben keine Hinweise darauf, dass die Aptamere an FIXa und FX oder FVIIIa binden und deren Gerinnungsaktivität verändern.

Diese Resultate stimmten mit den Versuchsergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein, bei denen die Bindung der HS02-Varianten an Thrombin, FVIIa FIXa und FXa anhand von Retentionsfilter untersucht wurde (Müller et al., 2009). Bei dieser Überprüfung konnte eine signifikante Bindung der Aptamere an die genannten Gerinnungsfaktoren ausgeschlossen werden.

Der Originalsequenz HS02-88 konnte ein konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt auf die APC-vermittelte Faktor VIIIa-Inaktivierung zugeordnet werden (Abb. 17). Der Verlust der Faktor VIII-Aktivität wurde bei einem 100-fach molaren Überschuss des Aptamers auf etwa 10 % begrenzt. HS02-88 verhält sich damit wie die Mehrzahl der proteinbindenden Aptamere, die in der Regel Inhibitoren ihrer Zielmoleküle sind. Nur wenigen der bisher synthetisierten Aptamere wurde eine aktivitätsfördernde Wirkung auf ein Protein nachgewiesen (Kulbachinsky, 2007; Pendergrast et al., 2005). Ein bereits Ende der 90iger Jahre gegen APC selektiertes RNA-Aptamer konnte ebenfalls die Hemmung der proteolytischen APC-Aktivität erreichen (Gal et al., 1998). In dieser Studie zeigte Gal et al. (1998), dass RNA-Aptamere als Inhibitoren der Spaltungsreaktion eines fluorogenen APC-Substrates durch APC wirkten. Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit analysierten DNA-APC-Aptamer besaß das RNA-Aptamer von Gal et al. (1998) jedoch eine deutlich schlechtere Bindungsaffinität zu APC. Die Dissoziationskonstante von HS02 beträgt 0,12 nM (+ 0,02 nM) (Kapitel 2.6.4), das RNA-Aptamer hingegen wies eine Dissoziationskonstante von 110 nM auf. Weiterführende Studien des RNA-APC-Aptamers sind nicht publiziert worden.

Für die Ermittlung des Minimalmotivs wurde aus den Messwerten der einzelnen HS02-Varianten die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt. Diese Kenngröße gibt an, bei welcher HS02-Konzentration 50 % der APC-Wirkung gehemmt ist und beschreibt die Wirkstärke der APC-inhibierenden Aptamere. Die in Tabelle 9 aufgeführten IC_{50} -Werte identifizieren HS02-44G als das gesuchte Minimalmotiv. Alle in der tabellarischen Auflistung nachfolgenden Aptamer-Kandidaten, die um weitere Nukleotide verkürzt wurden, bewirkten eine Erhöhung der IC_{50} -Werte.

Das Hauptziel der Bestimmung eines Minimalmotivs war die Zuordnung von relevanten Strukturen des Aptamers HS02, die zur effektiven Bindung an APC notwendig sind. Durch Identifizierung des Aptamer-Kandidaten HS02-44G als Minimalmotiv konnte diesbezüglich eine Stem-Loop-Struktur, die sich aus einer minimalen Länge von 44 Nukleotiden ergibt und die 14-Basen lange Konsensussequenz enthält, ermittelt werden. Weitere essentielle Bindungsbestandteile von HS02 sind ein durch Basentausch (Austausch eines T-Nukleotids gegen ein G-Nukleotid) stabilisierter Basisstamm sowie ein darin enthaltener CT-Basenüberhang.

Ein abschließendes Experiment diente dazu, die Vergleichbarkeit der HS02-Ausgangssequenz HS02-88 und des Minimalmotivs HS02-44G bezüglich ihres Effektes auf die antikoagulatorische Fähigkeit von APC zu überprüfen. Für diesen direkten Vergleich der HS02-Varianten erfolgte die Bestimmung der FVIIIa-Halbwertszeiten. Zusätzlich wurde innerhalb des gleichen Versuchs die FVIIIa-Halbwertszeit in Gegenwart des unselektierten D1-Pools ermittelt. Dieses Vorgehen sollte sicherstellen, dass die Inaktivierung von APC den getesteten HS02-Varianten zugeschrieben werden kann. Ausgeschlossen werden sollte damit die Möglichkeit, dass die Beeinflussung der APC-Aktivität auf unspezifische Nukleinsäure-Einflüsse beruht, also unabhängig von der HS02-Struktur ist und durch ein zufälliges DNA-Molekül hervorgerufen wurde. Aptamere und D1-Pool lagen im Versuch in einem 10-fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum eingesetzten APC vor. Im Gegensatz zum D1-Pool

bewirkten beide Aptamer-Kandidaten innerhalb des untersuchten Zeitraums von 30 Minuten eine signifikante Verlängerung der FVIIIa-Halbwertszeit (Abbildung 19). Der Aktivitätsverlust von FVIIIa konnte durch beide HS02-Varianten auf 23 und 25 % begrenzt werden. Damit liegen die erhaltenen Restaktivitäten von FVIII ebenso wie bei der Überprüfung mit der bis zu 10-fach höheren HS02-88 Konzentration (Abbildung 17) unter 100 %. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass durch HS02 die antikoagulatorische APC-Aktivität nur unvollständig gehemmt werden kann.

Aufgrund der aufgezeigten hemmenden Wirkung auf die proteolytische APC-Aktivität im Rahmen der FVIIIa-Inaktivierung ist es denkbar, dass der Einsatz von HS02-Aptameren als Adjuvant bei der Hämophilie A-Behandlung mit FVIII-Präparaten eine Verringerung des proteolytischen Abbaus des substituierten FVIII durch APC im Patientenkörper bewirken kann. Auf diese Weise könnte der FVIII-Spiegel im Blut, der für eine ausreichende Thrombinbildung zur Verhinderung von Blutungen erforderlich ist, mit Hilfe einer geringeren FVIII-Dosis aufrecht erhalten werden. Der Verbrauch von FVIII-Präparaten könnte so reduziert werden.

Der in dieser Arbeit festgestellte einheitliche Ablauf des proteolytischen FVIII-Abbaus durch APC und die ähnlichen APC-Sensitivitäten der zehn untersuchten FVIII-Präparate sollte sich nutzbringend bei einem solchen Einsatz von HS02-Aptameren auswirken.

Vom Prinzip eines APC-Inhibitors als prokoagulatorisches Agens bei Hämophilie A wurde bereits im Jahr 1998 berichtet (Butenas und Mann, 1998; De Nanteuil et al., 2006). Die Generation von Thrombin konnte durch einen pseudopeptischen Inhibitor gesteigert werden, so dass das Fehlen von FVIII in der Blutgerinnung vollständig kompensiert werden konnte.

Die aufgezeigte Hemmung der APC-induzierten FVIIIa-Spaltung kann auf verschiedene Inaktivierungs-Mechanismen beruhen. Als einer der möglichen Hemm-Typen kann eine sterische Hinderung erwägt werden, welche die Spaltung von FVIIIa durch APC blockiert. Möglich ist weiterhin eine nicht-kompetitive Hemmung, bei der sich der Inhibitor (HS02) nicht an die aktive Stelle, sondern an eine andere Position (allosterisch) des APC-Moleküls anlagert und dieses eine Konformationsänderung durchführt. Ein nicht-kompetitiver Hemm-Modus wurde auch dem RNA-APC-Aptamer von Gal zugeschrieben (Gal et al., 1998).

Maßgeblich beteiligt an der proteolytischen FVIIIa-Inaktivierung durch APC ist neben der katalytischen Triade (His 211, Asp 257, Ser 360) im aktiven Zentrum eine Oberflächenregion der APC-Proteasen-Domäne, die abseits des aktiven Zentrum lokalisiert ist und eine große Ansammlung positiv geladener Aminosäurereste (Anion-binding-exosite) aufweist.

Schleifen-Strukturen (Loops) dieser APC-Region, in denen basische Reste als Cluster geballt vorliegen, vermitteln die Interaktion von APC mit seinen Substraten FVIIIa und FVa (Griffin et al., 2007). Ebenso beinhaltet diese sogenannte „basische Exosite“ eine Heparinbindungsstelle (Friedrich et al., 2001; Rezaie, 2003).

Diese Region positiver Ladungsdichte der Serin-Proteasen-Domäne ist möglicherweise im Hinblick auf die Bindung des Aptamers von wesentlicher Bedeutung. So wird in Bezug auf

die Assoziation von Aptamer und Zielmolekülen vermutet, dass aufgrund der stark negativen Ladung von Nukleinsäuren (bei physiologischem pH), elektrostatische Interaktionen einen dominierenden Anteil an der Aptamer-Target-Bindung besitzen. Eine Analyse von einigen RNA-Aptamer-Protein-Paaren zeigte, dass die Koordination von Aptamer und Target über elektronegative Taschen der RNA und positiv geladene Bereiche des Proteins erfolgt (James, 2001). In diesem Zusammenhang kann desgleichen die Gruppe der natürlichen DNA- oder RNA-bindenden Proteine betrachtet werden. Hier führt die asymmetrische Ladungsverteilung auf der Oberfläche von Proteinen dazu, dass die Molekülstruktur des Proteins, welche mit der Nukleinsäure interagiert, im Regelfall partiell positive Ladung trägt. Des Weiteren binden Aptamere, die gegen DNA - oder RNA-bindende Proteine gerichtet sind, im Allgemeinen an diese natürlichen Bindestelle der Nukleinsäure (Kulbachinsky, 2007).

Insofern kann die Erwägung in Betracht gezogen werden, dass sich das APC-Bindungszeptor von HS02 im Bereich der die Loop-Strukturen enthaltenen positiv geladenen Anion-Binding-Exosite der Protease-Domäne befindet. Gal et al. (1998) nahmen in ihrer Untersuchung zum RNA-APC-Aptamer ebenfalls eine Verbindung zwischen diesem Bereich positiver Ladungsdichte auf der APC-Oberfläche und der Bindung des RNA-Moleküls an APC an. In späteren Publikationen von Forschern aus der Gruppe um Gal, deren Gegenstand nicht das betreffende APC-RNA-Aptamer war, bestätigten die Wissenschaftler diese Vermutung. So konnte, laut unveröffentlichter Daten, im Anschluss an die Publikation aus dem Jahr 1998 als Erkennungs- und Bindungsstruktur des APC-RNA-Aptamers, ein Lysin-Cluster der APC-Oberflächen-Loops nachgewiesen werden (Fukuda et al., 2000; Hwang et al., 2000).

Im Rahmen der FVIIIa-Inaktivierung werden die entsprechend der Chymotrypsin-Nummerierung bezeichneten Loop 39 (Lys 37-Lys 39), Loop 60 (Lys 62-Lys 63) und Loop 70-80 (Arg 74,-Arg 75 und Lys 78) eine essentielle Funktion zugeordnet (Manithody et al., 2003). Von diesen Oberflächen-Strukturen sind in die proteolytischen FVa-Inaktivierung sowohl Loop 37 als auch Loop 70-80 und zusätzlich auch der als autolysis loop bezeichnete APC-Loop 148 involviert (Griffin et al., 2007).

Es wird angenommen, dass die basischen Resten von Loop 39 und Loop 70-80 eine direkte Bindungsstelle für FVa und vermutlich auch für FVIIIa darstellen und diese infolgedessen eine ausschlaggebende Bedeutung bei der Spaltung der beiden Gerinnungsfaktoren besitzen (Rezaie, 2003).

In weiterführenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die HS02-Aptamere auch in der Plasma- und Vollblut-Matrix aktiv sind und ebenfalls die APC-vermittelte Inhibierung von FVa blockieren. Auch konnte mittels Filterbindungsanalysen belegt werden, dass die Bindung der Aptamere an APC direkt kompetitiv mit der Bindung von Heparin konkurriert. Somit scheint die basische Exosite als Bindungsregion der HS02-Aptamere bestätigt zu sein.

Aufgrund dieses Umstandes wurde ebenfalls der Einfluss der Aptamere auf die Inhibition von APC durch PCI überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die Aptamere die Komplexbildung zwischen APC und PCI in Abhängigkeit von ihrer Moleküllänge beschleunigen. Dies

sollte auf einen allosterischen Effekt zurückzuführen sein, da die HS02-Aptamere, im Gegensatz zu Heparin, keinen ternären Komplex mit APC und PCI ausbilden.

Da außerdem kein Einfluss der Aptamere auf die antiapoptotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften festgestellt werden konnte, stellen sich die Aptamere als potente Inhibitoren der antikoagulatorischen Eigenschaften von APC dar (Müller et al. 2009).

6. Ausblick

Die zu Beginn des ersten Teils dieser Dissertationsarbeit durchgeführten Aktivitätsbestimmungen der zehn FVIII-Konzentrate unterstreichen die Erfordernis, bestehende Methoden der FVIII-Bestimmung zu optimieren bzw. deren Standardisierung zu verbessern. Sinnvoller Ansatz ist hierbei vermutlich bereits die bessere Standardisierung der FVIII-Konzentrat-Analyse, die durch die Hersteller zur Beurteilung und Deklaration der Aktivitäten der Gerinnungspräparate erfolgt. Erwägt werden kann außerdem, ob die Erweiterung des „like-versus-like Prinzips“ auf produkt-spezifische FVIII-Standards zweckdienlich bzw. praxistauglich für die Bestimmung von FVIII-Konzentraten sein kann um die Messgenauigkeit zu erhöhen. In Zukunft kann die Entwicklung von neuen alternativen FVIII-Bestimmungsmethoden einen wichtigen Fortschritt bedeuten.

Es verbleibt, die in dieser Arbeit festgestellte unterschiedliche Thrombin-Sensivität von plasmabasierten und rekombinanten FVIII-Präparaten in Plasmaproben zu überprüfen. Sollte sich das Versuchsergebnis bestätigen, sind Untersuchungen angezeigt, die Aufschluss darüber bringen, ob die unterschiedliche Auswirkung der Thrombin-Konzentration auf die beiden FVIII-Präparat-Gruppen mit molekularen Unterschieden von FVIII zusammenhängt. Die Publikation von Saenko et al., (2001) zeigte, dass die Qualität des Plasma-Pools der größte Einflussfaktor bei der Festlegung der strukturellen Veränderungen der C2-Domäne von FVIII ist und bestimmte Schritte im Herstellungsverfahren (Kombination von Solvent-Detergens-Behandlung und Pasteurisierung) diese verstärken. Dabei machen die strukturellen Veränderungen der C2-Domäne die gesteigerte Immunogenität der entsprechenden FVIII-Konzentrate aus.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Dissertation konnte DNA-APC-Aptameren eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung auf die APC-vermittelte FVIIIa-Inaktivierung im gereinigten System nachgewiesen werden. Um diesen Effekt von HS02 auf APC in der Zukunft nutzbringend einzusetzen sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Erforderlich ist die Überprüfung der Wirkung von HS02 auf die APC-induzierte FVIII-Inaktivierung in Plasmaproben. Von Interesse ist im Zusammenhang mit diesen Versuchen unter anderem, ob anwesende APC-Kofaktoren (Protein S und FV), einen Einfluss auf die HS02-Wirkstärke bezüglich der APC-Inhibierung ausüben. Nach einer Studie von Gale et al. (2008) steigern diese beiden APC-Kofaktoren die APC-vermittelte FVIIIa-Inaktivierung.

Potentielle Einsatzgebiete des untersuchten APC-Aptamers HS02 liegen in den Bereichen von Diagnostik und Therapie. Wie bereits in Kapitel 5.4. aufgeführt, kommt eine mögliche Anwendung eines APC-Aptamers als Adjuvant zur APC-Inaktivierung bei der Substitutionstherapie der Hämophilie A mit FVIII-Präparaten in Betracht.

Dem APC-Aptamer HS02 konnte auch eine Hemmung der APC-vermittelten FVa-Inaktivierung zugeordnet werden (Müller et al., 2009). Dies könnte sich zusätzlich positiv bzw. unterstützend auf die Hämostasefähigkeit von Hämophilie A-Patienten auswirken. So lieferten Untersuchungen mit Tiermodellen aus gentechnisch veränderten Mäusen mit Hämophilie A und Faktor V Leiden Hinweise dafür, dass die verringerte FVa-Spaltung durch

APC eine Verbesserung des Phänotyps der Hämophilie A bewirkt. Allerdings begrenzte sich die verstärkende Wirkung auf die Blutgerinnung auf den Bereich der Mikrozirkulation (Schlachterman et al., 2005). Bei einem weitergehenden Ausblick in die Zukunft könnte die Entwicklung eines zum APC-Aptamer komplementären Oligonukleotid-Antidots eine interessante Perspektive zur Kontrolle der Aptamer-Funktion von HS02 darstellen. Ein derartig regulierbares System aus einem antikoagulatorisch aktiven Aptamer gegen FIXa und entsprechendem komplementären Oligonukleotid-Antidot konnte bereits in Tierversuchen demonstriert werden (Rusconi et al., 2004). Auch konnte dieses System aus Aptamer und Antidot in einer klinische Studie mit gesunden menschlichen Studienteilnehmern erfolgreich eingesetzt werden (Dyke et al., 2006). Eine Situation, die eine unmittelbare Neutralisierung des Effektes eines APC-inhibierenden Aptamers erforderlich machen sollte, ist die Entstehung von Thrombosen als Folge eines zu starken Absinkens des APC-Plasmaspiegels.

Ebenfalls denkbar ist der Einsatz von HS02 als APC-Antidot. Von Bedeutung könnte ein solches Gegenmittel im Fall von Blutungen sein, welche als Nebenwirkung unter der Infusion von Xigris bei der Sepsistherapie auftreten können (Fumagalli and Mignini, 2007; Goldstein et al., 2006).

In der Diagnostik stellen APC-Aptamere eine aussichtsreiche Option dar, um eine Verbesserung bei der Messung des APC-Spiegels im Plasma zu erreichen. Die bisherigen Methoden zur APC-Bestimmung sind nur unzureichend sensitiv und zeichnen sich durch eine schlechte praktische Durchführbarkeit aus (Levi, 2003; Liaw et al., 2003). Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die HS02-Varianten für PC, im Vergleich zu APC, eine etwa 200-fach schwächere Bindungsaffinitäten besitzen (Müller et al., 2009). Diese hohe Spezifität für die aktive Form des Proteins stellt eine gute Perspektive für die Verwendung von HS02 zur APC-Bestimmung dar.

7. Zusammenfassung

Proteolytische Aktivität von APC bei der Inaktivierung verschiedener Faktor VIII-Präparate und bei der Faktor VIIIa-Inaktivierung in Gegenwart eines APC-DNA-Aptamers

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Abschnitt überprüft, ob Unterschiede in der proteolytischen Aktivität von APC bei der Inaktivierung von fünf aktivierten humanen pb- und fünf rFVIII-Präparaten sowie Unterschiede in den APC-Sensitivitäten dieser FVIII-Präparate zu ermitteln sind. Zu Beginn der Untersuchungsreihe wurden die eingesetzten FVIII-Präparate funktionell analysiert. Hierzu wurde untersucht, ob Unterschiede in der vergleichenden Aktivitätsbestimmung durch verschiedene Messmethoden und in der Thrombin-vermittelten Aktivierung der zehn humanen FVIII-Präparate zu ermitteln sind.

Die vergleichende Aktivitätsbestimmung der FVIII-Präparate mit zwei verschiedenen aPTT-basierten koagulometrischen Messungen und einem chromogenem Peptid-Substrat-Assay zeigte deutliche Ergebnisdiskrepanzen innerhalb der verschiedenen Messmethoden. In den Gerinnungszeitmessungen wurden dabei höhere FVIII-Bestimmungswerte gemessen. Außerdem wurde festgestellt, daß pbFVIII-Präparate signifikant höhere Aktivitäten in allen drei Bestimmungen aufwiesen. Die erzielten Resultate repräsentieren die bestehende schwierige Situation, den Gehalt an FVIII in Gerinnungskonzentraten oder Plasmaproben exakt zu bestimmen. Neben Aspekten zur Testdurchführung wurden als vorrangige Ursachen für die in dieser Arbeit erreichten Versuchsergebnisse mögliche Einflüsse der FVIII-Molekülstruktur, Herstellungsverfahren und Inhaltsstoffe, wie Von-Willebrand-Faktor und aktiviertem FVIII (FVIIIa), vermutet.

Ermittelt wurden deutliche Unterschiede zwischen der Gruppe der plasmabasierten und der Gruppe der rekombinanten FVIII-Präparate bei der Aktivierbarkeit durch Thrombin. Aus Plasma gewonnene FVIII-Konzentrate erreichten eine statistisch signifikant höhere Thrombin-induzierte Aktivitätsbildung. Die Gruppe der rekombinanten FVIII-Konzentrate bildeten in den Aktivierungsversuchen ihre maximalen Aktivitäten durch eine geringere Menge an Thrombin aus als plasmabasierte FVIII-Konzentrate, was auf eine höhere Thrombin-Sensitivität der rFVIII-Präparate hinweist.

Faktor VIII-Aktivierungsexperimente mit reduzierter pbFVIII-Menge sowie erhöhter rFVIII-Menge ließen nicht ausschließen, dass aus Plasma gewonnene FVIII-Präparate Inhaltsstoffe aufweisen, die die Aktivität von Thrombin hemmen. Der aufgebaute Thrombin-Neutralisationstest zum Nachweis von möglichen Thrombin-Inaktivatoren zeigte keine Hinweise dafür, dass plasmabasierte FVIII-Konzentrate thrombin-inhibierende Einheiten beinhalten, die einen Einfluss auf die Aktivität von Thrombin ausüben. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde dem etablierten Assay die Fähigkeit zugewiesen, einen Thrombin-Inaktivator nachzuweisen, der mindestens über ein fünfzehntel der Stoffmengenkonzentration von Thrombin verfügt.

Die ermittelten FVIIIa-Restaktivitäten, die nach der Inkubation mit APC vorlagen und die jeweiligen IC_{50} -Werte wurden zum Vergleich der proteolytischen Inaktivierung der FVIII-

Präparate durch APC und zur Analyse der APC-Sensitivität der einzelnen Präparate herangezogen.

Unterschiede bei der proteolytischen APC-Aktivität bezüglich der Spaltung von FVIIIa verschiedener FVIII-Präparate wurde nicht festgestellt.

Die IC₅₀-Werte lagen in einem Bereich von 0,81 und 1,99 nM. Das Versuchsergebnis weist darauf hin, dass plasmabasierte und rFVIII-Präparate vergleichbare APC-Sensitivitäten besitzen.

Ziel des zweiten Abschnitts der Dissertation war, den Einfluss der von der Arbeitsgruppe hergestellten APC-Aptamere HS02 auf die proteolytische Aktivität von APC in Hinblick auf die APC-induzierte FVIIIa-Inaktivierung zu prüfen.

Es konnte gezeigt werden, dass das in seiner Originalsequenz 88 Nukleotide umfassende Aptamer HSO2-88 die antikoagulatorische Aktivität von APC fast vollständig inhibiert. Bei einem 100-fachen molaren Aptamer-Überschuss von HSO2-88 im Verhältnis zum eingesetzten APC konnte die Reduzierung der FVIIIa-Aktivität auf 10 % limitiert werden. Hinweise dafür, dass durch die Aptamere die Mitglieder des intrinsischen Tenase-Komplexes in ihrer Aktivität beeinflusst werden, konnten anhand von APC-freien Kontrollen nicht gefunden werden.

Anhand der ermittelten IC₅₀-Werte wurde als Minimalmotiv die Aptamer-Variante HSO2-44G identifiziert. Durch Einsatz der Aptamere HSO2-88 und HSO2-44G konnte eine signifikante Verlängerung der FVIIIa-Halbwertszeit im untersuchten Zeitraum von 30 Minuten erreicht werden.

Aus den Versuchsergebnissen wurde gefolgert, dass essentielle Sekundärstrukturelemente für die Bindung des Aptamers an APC eine aus minimal 44 Nukleotiden gebildete Stem-Loop-Struktur mit der enthaltenen Konsensussequenz aus 14 Nukleotiden sowie ein CT-Basenüberhang sind.

Die Daten legen nahe, dass die Bindungsstelle des Aptamers im Bereich einer durch basische Aminosäurereste positiv geladenen Oberflächenregion der Proteasen-Domäne des APC-Moleküls lokalisiert ist.

HS02-Aptamere bieten das Potential, als spezifische Inhibitoren der proteolytischen APC-Aktivität bei der FVIIIa-Inaktivierung in der Hämophilie A Behandlung zu wirken. In diesem Zusammenhang könnten die Aptamere einsetzbar sein als potentiell Adjuvants, um den Verbrauch an FVIII-Konzentraten in der Substitutionstherapie zu verringern. HS02-Aptamere könnten daneben auch nutzbringend sein als mögliches APC-Antidot und in der Diagnostik zur Bestimmung des APC-Spiegels im Plasma.

8. Summary

Proteolytic activity of APC on inactivation of different Factor VIII-preparations and on Factor VIIIa-inactivation in presence of an APC-DNA-Aptamer

In the first part of the present publication was examined, if differences in proteolytic APC-activity on FVIIIa-inactivation of five activated human pb- and five rFVIII-concentrates as well as differences in APC-sensitivities of these FVIII-preparations are detectable.

At the beginning of the test series FVIII-preparations were functional analysed. Therefore FVIII-preparations were examined for differences in comparative determination of activity by different methods of measurement and thrombin-mediated activation.

Comparing determination of FVIII-activity were measured on the basis of two different aPTT-based coagulation measurements and a chromogenic peptid substrate assay. Results differed considerably depending on the method used with aPTT-based coagulometric assays showing higher FVIII-activities than the chromogenic method. Also it was found out that plasma-derived FVIII-preparations in all of the three measurements possess significant higher activities. These results represent the existing difficult situation to exactly define the amount of FVIII in FVIII concentrates and plasma samples. Besides aspects of test procedure, potential influences of the FVIII-molecule structure, manufacturing processes and ingredients like von Willebrand Factor and activated FVIIIa were also discussed as primary causes for the achieved test-results mentioned in the dissertation.

Survey of activatability by Thrombin showed remarkable discrepancies between the group of plasma-derived and the group of recombinant FVIII preparations. Plasma-derived FVIII concentrates were characterised by a statistically significant higher thrombin-induced activity. In the activation-tests the group of recombinant FVIII-Concentrates built their maximum activities by means of a lower amount of thrombin than the plasma-derived FVIII concentrates. This test result was interpreted as expression of a higher thrombin-sensitivity of the recombinant FVIII concentrates.

FVIII-activation-experiments with a reduced amount of pbFVIII and a higher amount of rFVIII could not rule out that pbFVIII preparations contain ingredients which inhibit the activity of thrombin. The developed thrombin neutralization test for detection of thrombin-inactivators showed no evidence of thrombin-inhibiting units in plasma-derived FVIII concentrates which would influence the activity of thrombin. Due to the achieved results the established test was attributed the capability to detect a thrombin inactivator which possesses at least one fifteenth of the concentration of thrombin.

Determined FVIII residual activities, which exists after incubation with APC, and respective IC_{50} -values were used in order to compare proteolytic inactivation of the FVIII-peparations by APC and for analysis APC-sensitivities of each preparation.

Differences in proteolytic APC-activities relative to cleavage of FVIIIa in different FVIII-preparations was not found.

IC_{50} -values were between 0,81 and 1,99 nM. The test results indicate, that plasma-derived and recombinant FVIII-preparations possess comparable APC-sensitivities.

Aim of part two of the present study was to analyse the influence of DNA-Aptamers HS02, constructed in the study group, on proteolytic APC-activity with regard to the APC-induced FVIII-inactivation.

It was possible to show, that APC-aptamer HS02-88, consisting of 88 nucleotides in its original sequence, inhibit almost completely the anticoagulant activity of APC. A 100-fold molar aptamer-excess of HS02-88 in relation to the inserted APC was able to limit the reduction of FVIIIa activity to 10 %. APC-free control samples did not indicate that aptamers influence the activity of members of the intrinsic tenase complex.

Aptamer variant HS02-44G was identified as the minimal motif on the basis of IC_{50} -values. Aptamers HS02-88 and HS02-44G reached significant prolongation of FVIIIa half-life time in a sample period of 30 minutes.

The results of experiments suggest that essential structural elements of the aptamer binding to APC are: a secondary structure that contains a Stem-Loop-Structure, built from a minimum of 44 nucleotides and comprising the 14 nucleotide consensus sequence as well as a CT bulge.

It was therefore assumed that the binding site of the aptamer is located to the positively charged surface region (anion-binding-exosite) of the APC-protease domain, which consists of a cluster of basic residues.

HS02-aptamers offer the potential to work as specific inhibitors of proteolytic APC-activity for FVIIIa-inactivation in hemophilia A treatment. In this context the aptamers could be useful as potential adjuvants to decrease the consumption of FVIII-concentrates in replacement therapy. Besides HS02-aptamers may be used as potential APC-Antidot and in diagnostics for determination of APC levels in plasma.

9. Literaturverzeichnis

Adams, T.E., Everse S.J., Mann, K.G. (2003)

Predicting the pharmacology of thrombin inhibitors.

J Thromb Haemost 1 (5): 1024-1027

Aird, W.C. (2005)

Coagulation.

Crit Care Med 33 (12 Suppl): S485-487

Aznar, J., Espana, F., Estelles, A., Royo, M. (1996)

Heparin stimulation of the inhibition of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor-influence of the molecular weight of heparin and ionic strength.

Thromb Haemost 76(6): 983-988

Bae, J.S., Yang, L., Manithody, C., Rezaie, A.R. (2007)

Engineering a Disulfide Bond to Stabilize the Calcium-binding Loop of Activated Protein C Eliminates Its Anticoagulant but Not Its Protective Signaling Properties.

J Biol Chem 282(12): 9251-9

Barrowcliffe, T.W., Raut, S., Hubbard, A.R. (1998)

Discrepancies in potency assessment of recombinant FVIII concentrates.

Hemophilia 4 (4): 634-640

Barrowcliffe, T.W., Raut, S., Sands, D., Hubbard, A.R. (2002)

Coagulation and Chromogenic Assay of Factor VIII Activity :General Aspects, Standardization, and Recommendations.

Semin Thromb Hemost 28(3): 247-256

Barrowcliffe, T.W., Tubbs, J.E., Wong, M.Y. (1993)

Evaluation of factor VIII deficient plasma.

Thromb Haemost 1, 70 (3): 433-437

Barthels, M., Schramm, W. (2004)

Gerinnungsfaktorenkonzentrate.

Hämostaseologie 24: 286-297

Becker, R.C., Rusconi, C., Sullenger, B. (2005)

Nucleic acid aptamers in therapeutic anticoagulation.

Technology, development and clinical application.

Thromb Haemost 93(6):1014-1020

Behrmann, M., Pasi, J., Saint-Remy, J.-M. R., Kotitschke, R., Kloft, M. (2002)
Von Willebrand Factor Modulates Factor VIII Immunogenicity: Comparative Study of
Different Factor VIII Concentrates in a Haemophilia A Mouse Model.
Thromb Haemost 88: 221-229

Berkner, K.L. (2000)
The Vitamin K-Dependent Carboxylase.
Annu Rev Nutr 25: 127-149

Bhopale, G.M, Nanda R.K. (2003)
Blood coagulation factor VIII: An overview.
J Biosci 28(6): 783-789

Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M., Schluesener, H. (2001)
Systematic Evolution of a DNA Aptamer Binding to Rat Brain Tumor Microvessels.
Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen.
J Biol Chem 276(19): 16464-16468

Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H., Toole, J.J. (1992)
Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin.
Nature 355(6360): 564-6

Boghog, Beitrag zur Internetenzyklopädie Wikipedia (2011)
Protein C 1D schematic
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_C_1D_schematic.png
Letzte Revision 2. Januar 2011
Tagesdatum 7. Juni 2012

Bowen, D.J. (2002)
Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights.
Mol Pathol 55(2): 127-144

Breaker, R.R. (2004)
Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology.
Nature 432(7019): 838-845

Butenas, S., Mann, K. (1998)
Peptidomimetics Containing 6-Peptidylamino-1-Naphthalenesulfonamide Moieties.
World Patent WO 98/22125

Butenas, S., Mann, K.G. (2002)
Blood Coagulation.

Biochemistry (Mosc) 67(1): 3-12

Castaman, G., Federici, A.B., Rodeghiero, F., Mannucci, P.M. (2003)

Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment.

Haematologica 88(1): 94-108

Castoldi, E., Brugge, J.M., Nicolaes, G.A.F., Girelli, D., Tans, G., Rosing, J. (2004)

Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations.

Blood 103(11): 4173-4179

Chandler, W.L., Ferrell, C., Lee, J., Tun, T., Kha, H. (2003)

Comparison of Three Methods for Measuring Factor VIII Levels in Plasma.

Am J Clin Pathol 120(1): 34-39

Cinotti, S., Paladino, E., Morfini, M. (2006)

Accuracy of FVIII :C assay by one-stage method can be improved using hemophilic plasma as diluent.

J Thromb Haemost 4: 828-833

Crawley, J.T.B., Zanardelli, S., Chion, C.K., Lane, D.A. (2007)

The central role of thrombin in haemostasis.

J Thromb Haemost Suppl 1: 95-101

Dahlbäck, B. (2005)

Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases.

J Intern Med. 257(3): 209-223

Dahlbäck, B., Villoutreix, B.O. (2005a)

The anticoagulant protein C pathway.

FEBS Letters 579: 3310-3316

Dahlbäck, B., Villoutreix, B.O. (2005b)

Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway: Novel insights Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(7): 1311-1320

De Nanteuil, G., Gloanec, P., Beguin, S., Giesen, P.L.A., Hemker, H.C., Mennecier, P., Rupin, A., Verbeuren, T.J. (2006)

Low molecular Weight Activated Protein C Inhibitors as a Potential Treatment for Hemophilic Disorders.

J Med Chem 49: 5047-5050

Di Cera, E. (2007)

Thrombin as proagulant and anticoagulant.

J Thromb Haemost 5 Suppl 1:196-202

Drolet, D.W., Moon-Mc Dermott, L., Romig, T.S. (1996)

An enzyme-linked oligonucleotide assay.

Nat Biotechnol 14(8): 1021-1025

Dyke, C.K., Steinhubl, S.R., Kleinman, N.S., Cannon, R.O., Aberle, L.G., Lin, M., Myles, S.K., Melloni, C., Harrington, R.A., Alexander, J.H., Becker, R.C., Rusconi, C.P. (2006)

First-in-Human Experience of an Antidote-Controlled Anticoagulant Using RNA Aptamer Technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity.

Circulation 114(23): 2490-2497

Eaton, B.E., Pieken, W.A. (1995)

Ribonucleosides and RNA.

Annu Rev Biochem. 64: 837-863

Eaton, D., Rodriguez, H., Vehar, G.A. (1986a)

Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity.

Biochemistry 25 (2): 505-512

Eaton, D.L., Wood, W.I., Eaton, D., Hass, P.E., Hollingshead, P., Wion, K., Mather, J., Lawn, R.M., Vehar, G.A., Gorman, C. (1986b)

Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule.

Biochemistry 25 (26): 8343-8347

Ellington, A.D., Szostak, J. (1990)

In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.

Nature 346: 812-822

El-Maari, O., Schwalbach, J., Herbiniaux, U., Hanfland, P., Oldenburg, J. (2003)

Functional Analysis of the Factor VIII B Domain.

In: Scharrer I, Schramm W, eds 34th Hemophilia Symposium Hamburg 2005: 334-337

- Esmon, C.T. (2003)
The Protein C Pathway.
Chest 124(3 Suppl): 26-32
- Famulok, M., Mayer, G. (2005)
Intramers and Aptamers: Applications in Protein-Function Analyses and Potential for Drug Screening.
Chembiochem 6(1): 19-26
- Famulok, M., Mayer, G., Blind, M. (2000)
Nucleic Acid Aptamers-From Selection in Vitro to Applications in Vivo.
Acc Chem Res 33(9): 591-599
- Farokhzad, O.C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.N.T., LaVan, D.A., Langer, R. (2004)
Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells.
Cancer Res 64 (21): 7668-7672
- Fay, P.J. (2004)
Acitvation of factor VIII and mechanism of cofactor action.
Blood Rev 18(1): 1-15
- Fay, P.J., Haidaris, P.J., Huggins, C.F. (1993)
Role of the COOH-terminal Acidic Region of A1 Subunit in A2 Subunit Retention in Human Factor VIIIa.
J Biol Chem 268(24): 1781-1786
- Fay, P.J., Mastri, M., Koszelak, M.E., Wakabayashi, H. (2001)
Cleavage of Factor CIII Heavy Chain Is Required for the Functional Interaction of A2 Subunit with Factor IXa.
J Biol Chem 276(15): 12434-12439
- Friedrich, U., Blom, A.M., Dahlbäck, B., Villoutreix, B.O. (2001)
Structural and energetic characteristics of the heparin-binding site in antithrombotic protein C.
J Biol Chem 276(26): 24122-24128
- Fukuda, K., Vishnuvardhan, D., Sekiya, S., Hwang, J., Kakiuchi, N., Taira, K., Shimotohno, K., Kumar, P.K., Nishikawa, S. (2000)
Isolation and characterisation of RNA aptamers specific fort he hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease.
Eur J Biochem 267(12): 3685-3694
- Fumagalli, R., Mignini, M. (2007)

The safety profile of drotrecogin alfa (activated).

Critical Care 11 Suppl 5: 6-8

Gal, S.W., Amontov, S., Urvil, P.T., Vishnuvardhan, D., Nishhikawa, F., Kumar, P.K.R., Nishhkawa, S. (1998)

Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function.

Eur J Biochem 252(3): 553-562

Gale, J.A., Cramer, T.J., Rozenshteyn, D., Cruz, J.R. (2008)

Detailed mechanism of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V.

J Biol Chem 283(24): 16355-16362

Gilbert, J.C., DeFeo-Fraulini, T., Hutabarat, R.M., Horvath, C.H., Merlino, P.G., Marsh, H.N., Healy, J.M., BouFakhreddine, S.B., Hohhan, T.V., Schaub, R.G. (2007)

First-in-Human Evaluation of Anit-von Willebrand Factor Therapeutic Aptamer ARC1779 in Healthy Volunteers.

Circulation 116(23): 2678-2686

Goldstein, B., Nadel, S., Peters, M., Barton, R., Machado, F., Levy, H., Haney, D.J., Utterback, B., Williams, M.D., Giroir, B.P. (2006)

ENHANCE: results of a global open-label trial of drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis.

Pediatr Crit Care Med 7(3): 200-211

Gomez, K., Mc Vey, J.H. (2006)

Tissue Factor Initiated Blood Coagulation.

Front Biosci 11: 1349-1359

Gomez, K., McVey, J.H., Tuddenham, E. (2005)

Inhibition of coagulation by macromolecular complexes.

Haematologica 90(11): 1570-1576

Graw, J., Brackmann H., Oldenburg, J., Schneppenheim R., Spannagl M., Schwaab, R. (2005)

Haemophilia A: From Mutation Analysis to new Therapies.

Nature Reviews Volume 6: 488-501

Greinacher, A., Völpel, H., Janssens, U., Hach-Wunderle, V., Kemkes-Matthes, B., Eichler, P., Mueller-Velten, H.G., Pötzsch, B. (1999)

Recombinant Hirudin (Lepirudin) Provides Safe and Effective Anticoagulation in Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia : A Prospective Study.

Circulation 99(1): 73-80

Griffin, J.H., Fernandez, J.A., Gale, A.J., Mosnier, L.O. (2007)
Activated protein C.
J Thromb Haemost 5 Suppl 1: 73-80

Hamaguchi, N., Ellington, A., Stanton, M. (2001)
Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins.
Anal Biochem 294(2): 126-131

Heckel, A., Buff, M.C., Raddatz, M.S., Müller, J., Pötzsch, B., Mayer, G. (2006)
An anticoagulant with light-triggered antidote activity.
Angew Chem Int Ed Engl 45 (40): 6748-6750

Hermann, T., Patel, D.J. (2000)
Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers.
Science 287(5454): 820-825

Hill-Eubanks, D.C., Lollar, P. (1990)
von Willebrand Factor is a Cofactor for Thrombin-catalyzed Cleavage of the Factor VIII
Light Chain.
J Biol Chem 265(29): 17854-17858

Hill-Eubanks, D.C., Parker, C.G., Lollar, P. (1989)
Differential Proteolytic Activation of Factor VIII—von Willebrand Factor
Complex by Thrombin.
Proc Natl Acad Sci U S A 86 (17): 6508-1652

Hubbard, A.R., Weller, L.J., Bevan, S.A. (2002a)
Activation profiles of factor VIII in concentrates reflect one-stage/chromogenic potency
and discrepancies
Br J Haematol 117(4), 957-960

Hubbard, A.R., Weller, L.J., Bevan, S.A. (2002b)
A survey of one-stage and chromogenic potencies in therapeutic factor VIII concentrates
Br J Haematol. 117(1): 247-248

Hubbard, A.R., Sands, D., Seitz, R., Barrowcliffe, T.W. (2003)
A multi-centre collaborative study on the potency estimation of ReFacto et al., 2003
Thromb Haemost 90(6):1088-1093

Huntington, J.A., Li, W. (2009)

Structural insights into the multiple functions of protein c inhibitor.

Cell Mol Life Sci 66(1):113-121

Hwang, J., Fauzi, H., Fukuda, K., Sekiya, S., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Taira, K., Kusakabe, I., Nishikawa, S. (2000)

The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease.

Biochem Biophys Res Commun 279(2): 557-562

Ingerslev, J., Jankowski, M.A., Weston, S.B., Charles, L.A. and The REFACTO FIELD STUDY PARTICIPANTS (2004)

Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr Factor VIII :C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays.

J Thromb Haemost 2(4): 623-628

James, W. (2001)

Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery.

Curr Opin Pharmacol 1(5): 540-546

Jayasena, S.D. (1999)

Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics.

Clin Chem 45(9): 1628-1650

Kaufman, R.J., Pipe, S.W. (1999)

Regulation of Factor VIII Expression and Activity by von Willebrand Factor.

Thromb Haemost 82(2): 201-208

Kemball-Cook, G., Tubbs, J.E., Dawson, N.J., Barrowcliffe, T.W. (1993)

The behaviour of different factor VIII concentrates in a chromogenic factor X-activating System.

Br J Haematol 84(2): 273-278

Kessler, C. M. (2005)

New Perspectives in Hemophilia Treatment.

Hematology Am Soc Hematol Educ Program.: 429-435

Key, N.S., Negrier, C. (2007)

Coagulation factor concentrates: past, present, and future.

Lancet 370(9585): 439-48

Khrenov, A.V., Ananyeva, N.M., Saenko, E.L. (2006)

Role of the B domain in proteolytic inactivation of activated coagulation factor VIII by activated protein C and activated factor X.

Blood Coagul Fibrinolysis 17 (5): 379-388

Koszelak Rosenblum, M.E., Schmidt, K., Freas, J., Mastro, M., Fay, P.J. (2002)
Cofactor Activities of Factor VIIIa and A2 Subunit following Cleavage of A1 Subunit
at Arg 336.

J Biol Chem 277(14): 11664-11669

Kulbachinskiy, A.V. (2007)

Methods for Selection of Aptamers to Protein Targets.

Biochemistry (Mosc.) 72(13): 1505-1518

Lee, C.A., Owens, D., Bray, G., Giangrande P, Collins P, Hay C, Gomperts E, Schroth P,
Barrowcliffe T. (1999)

Pharmacokinetics of Recombinant Factor VIII (Recombinate) Using One-stage Clotting and
Chromogenic Factor VIII Assay.

Thromb Haemost 82(6): 1644-1647

Lenting, P.J., Mourik, J.A.van, Mertens, K. (1998)

The life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function.

Blood 92(11): 3983-3996

Lenting, P.J., Schooten D.J.M. van, Denis, C.V. (2007)

Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII.

J Thromb Haemost 5(7):1353-1360

Li, W., Adams, T.E., Kjellberg, M., Stenflo, J., Huntington, J.A. (2007)

Structure of native protein C inhibitor provides insight into its multiple functions.

J Biol Chem 282(18): 13759-13768

Liaw, P.C.Y., Ferrell, G., Esmon, C.T. (2003)

A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein
C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation.

J Thromb Haemost 1(4): 662-670

Levi, M. (2003)

Measuring activated protein C in plasma to assess its role as a critical modulator of
coagulation and inflammation.

J Thromb Haemost 1(4): 643-644

Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E. (2002)

An aptamer-based quartz crystal protein biosensor.

Anal Chem 74(17): 4488-4495

Lollar, P. (2003)

The factor VIII assay problem : neither rhyme nor reason.

J Thromb Haemost. 1(11): 2275-2279

Lollar, P. (2004)

Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: Factor VIII and Factor IX.

J Thromb Haemost 2(7): 1082-1095

Lollar, P., Hill-Eubanks, D.C., Parker, C.G. (1988)

Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor.

J Biol Chem 263(21): 10451-10455

Lundblad, R.L., Kingdon, H.S., Mann, K.G., White, G.C. (2000)

Issues with the Assay of Factor VIII Activity in Plasma and Factor VIII Concentrates.

J Thromb Haemost 84(6): 947-948

Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M. (2003)

New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding.

TrAC Trends in Analytical Chemistry 22(11): 810-818

Mairal, T., Özalp, V.C., Sanchez, P.L., Mir, M., Katakis, I., O'Sullivan, C.K. (2008)

Aptamers: molecular tools for analytical applications.

Anal Bioanal Chem 390(4): 989-1007

Makogonenko, E.M., Sarafanov, A.G., Ananyeva, N.M., Radtke, K.P., Strickland, D.K., Saenko, E.L. 2005.

B Domain of Coagulation Factor VIII Regulates Exposure of Its Heparin-Binding Site.

Blood 106: Abstract 1014

Manithody, C., Fay, P.J., Rezaie, A. (2003)

Exosite-dependent regulation of factor VIIIa by activated protein C.

Blood 101(12): 4802-4807

Mannucci, P.M. (2002)

Hemophilia and Related Bleeding Disorders: A Story of Dismay and Success.

Hematology 2002:1-9

Mannucci, P.M. (2003)

Hemophilia: treatment options in the twenty-first century.

J Thromb Haemost 1(7): 1349-1355

- Mannucci, M.D., Edward, G.D., Tuddenham, M.D. (2001)
The Hemophilias – From Royal Genes To Gene Therapy.
N Engl J Med 344(23):1773-1779
- Mather, T., Oganessyan, V., Hof, P., Huber, R., Foundling, S., Esmon, C., Bode, W. (1996)
The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C.
EMBO J 15(24): 6822-6831
- Mayer, G., Famulok, M. (2007)
Nukleinsäuren im Drug Discovery Prozess: Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche.
Pharm Unserer Zeit 6 (36): 432-536
- Mayer, G., Jenne, A. (2004)
Aptamers in Research and Drug Development.
BioDrugs 18(6): 351-359
- Meili, E.O. (2004)
Ausgeprägte Blutungsneigungen
Angeborener Mangel an Gerinnungsfaktor und erworbene Inhibitoren.
Hämostaseologie 24: 221-233
- Mikaellson, M., Oswaldsson, U., Sandberg, H. (1998)
Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity.
Haemophilia 4 (4): 646-650
- Mosnier, L.O., Griffin, J.H. (2006)
Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities.
Front Biosci 1,11: 2381-2399
- Müller, J., Isermann, B., Dücker, C., Salehi, M., Meyer, M., Friedrich, M., Madhusudhan, T., Oldenburg, J., Mayer, G., Pötzsch, B. (2009)
An Exosite-Specific ssDNA Aptamer Inhibits the Anticoagulant Functions of Activated Protein C and Enhances Inhibition by Protein C Inhibitor.
Chem Biol 16(4): 442-451
- Müller, J., Wulffen, B., Pötzsch, B., Mayer, G. (2007)
Multidomain Targeting Generates a High-Affinity Thrombin-Inhibiting Bivalent Aptamer.
Chembiochem 8(18): 2223-2226
- Myles, T., Church, F.C., Whinna, H.C., Monrad, D., Stone, S.R. (1998)
Role of Thrombin Anion-binding-exosite I in the Formation of Thrombin-Serpin Complexes.
J Biol Chem 273(47): 31203-31208

Myles, T., Yun, T.H., Leung, L.L. (2002)

Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin.

Blood 100(8): 2820-2826

Newell, J.L., Fay, P.J. (2007)

Proteolysis at Arg 740 Facilitates Subsequent Bond Cleavages during Thrombin-catalyzed Activation of Factor VIII.

J Biol Chem 282(35): 25367-25375

Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R., Adamis, A.P. (2006)

Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease.

Nat Rev Drug Discov. 5 (2): 123-132

Ngo, J.H.K., Huang, M., Roth, D.A., Furie, B.C., Furie, B. (2008)

Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex.

Structure 16(4) : 597-606

Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., Harrington, R.A., Sullenger, B.A. (2005a)

The Potential of Aptamers as Anticoagulant.

Trends Cardiovasc Med 15(1): 41-45

Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., Sullenger, B.A. (2005b)

Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics.

Annu Rev Med 56: 555-583

Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Nagata, M., Koide, T., Saenko, E.L., Tanaka, I., Shibata, M., Yoshioka, A. (2000)

Factor VIII C2 Domain Contains the Thrombin-binding Site Responsible for Thrombin-catalyzed Cleavage at Arg 1689.

J Biol Chem 275 (33) 2577-2580

Nogami, K., Zhou, Q., Myles, T., Leung, L.L.K., Wakabayashi, H., Fay, P.F. (2005)

Exosite-interactive Regions in the A1 and A2 Domains of Factor VIII Facilitate Thrombin-catalyzed Cleavage of Heavy Chain.

J Biol Chem 280 (18): 18476-18487

Nowak, G., Schrör, K. (2007)

Hirudin-the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medical leech to a recombinant drug and beyond.

Thromb Haemost 98(1):116-119

O'Brien, L.A., Gupta, A., Grinnell, B.W. (2006)

Activated Protein C in sepsis.

Front Biosci 11: 676-698

Oldenburg, J., Barthes, M. (2008)

Angeborene Koagulopathien am Beispiel der Hämophilie A und B, Hemmkörperhämophilie.

Hämostaseologie 28: 335-347

Panteleev, M.A., Ananyeva, N.M., Greco, N.J., Ataulakhanov, F.I., Saenko, E.L. (2006)

Factor VIIIa regulates substrate delivery to the intrinsic factor X-activating complex.

FEBS J 273(2): 374-387

Parker, E.T., Doering, C.B., Lollar, P. (2006)

A1 Subunit-mediated Regulation of Thrombin-activated Factor VIII A2 Subunit Dissociation.

J Biol Chem 281: 13922-13930

Parker, E.T., Pohl, J., Blackburn, M.N., Lollar, P. (1997)

Subunit structure and function of porcine factor Xa-activated factor VIII.

Biochemistry 36(31): 9365-9373

Pendergrast, P.S., Marsh, H.N., Grate, D., Healy, J.M., Shanton, M. (2005)

Nucleic Acid Aptamers for Target Validation and Therapeutic Applications.

J Biomol Tech 16(3): 224-234

Perera, L., Foley, C., Darden, T.A., Stafford, D., Mather, T., Esmon, C.T., Pedersen, L.G. (2000)

Modeling Zymogen Protein C.

Biophys J 79(6): 2925-43

Pieters, J., Lindhout, T., Hemker, H.C. (2005)

In Situ-Generated Thrombin Is the Only Enzyme That Effectively Activates Factor VIII and Factor V in Thrombin-Activated Plasma.

Blood 74(3): 1021-1024

Pike, R.N., Buckle, A.M., le Bonniec, B.F., Church, F.C. (2005)

Control of the coagulation system by serpins.

Getting by with a little help from glycosaminoglycans

FEBS J 272 (19): 4842-4851

Pipe, S.W. (2005)

The promise and challenges of bioengineered recombinant clotting factors.

J Thromb Haemost 3(8): 1692-1701

- Pipe, S.W., Kaufman, R.J. (1997)
Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIIIa.
Proc Natl Acad SCI U S A 94(22): 11851-11856
- Pipe, S.W., Miao, H.Z., Kucab, P.F., Mcvey, J.H., Kaufman, R.J. (2005)
The Secretion Efficiency of Factor VIII Can Be Regulated by the Size and Oligosaccharide
Content of the B Domain.
Blood 106: Abstract 687
- Pittman, D.D., Alderman, E.M., Tomkinson, K.N., Wang, J.H., Giles, A.R., Kaufman, R.J.
(1993)
Biochemical, Immunological, and In Vivo Functional Characterization of B-Domain-Deleted
Factor VIII.
Blood 1993 81(11): 2925-2935
- Plug, I., Mauser-Bunschoten, E.P., Bröcker-Vriends, A.H.J.T., van Amstel, H.K.P., van der
Born, J.G., van Diemen-Homan, J.E.M., Willeme, J., Rosendaal, F.R. (2006)
Bleeding carriers of hemophilia.
Blood 108(1): 52-56
- Preston, R.J.S., Ajzner, E., Razzari, C., Karageorgi, S., Dua, S., Dahlbäck, B., Lane, D.A.
(2005)
Multifunctional Specificity of the Protein C/Activated Protein C Gla Domain.
J Biol Chem 281(39): 28850-28857
- Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A. (2005)
Aptamers-basic research, drug development, and clinical applications.
Appl Microbiol Biotechnol 69(4): 367-374
- Raut, S., Di Giambattista, M., Bevan, S.A., Hubbard, A.R., Barrowcliffe, T.W., Laub, R.
(1998)
Modification of Factor VIII in Therapeutic Concentrates after Virus Inactivation by Solvent-
Detergent and Pasteurisation.
Thromb Haemost 80(4): 624-631
- Raut, S., Sands, D., Heath, A.B., Barrowcliffe, T.W. (2003)
Variability in factor VIII concentrate measurement : results from SSC field collaborative
studies.
J Thromb Haemost 1(9): 1927-1934
- Regan, L.M., Fay, P.J. (1995)

Cleavage of Factor VIII Light Chain Is Required for Maximal Generation of Factor VIIIa Activity

J Biol Chem 270(15): 8546-8552

Rezaie, A.R. (2003)

Exosite-Dependent Regulation of the Protein C Anticoagulant Pathway.

Trends Cardiovasc Med 13(1): 8-15

Riddel, J.P., Aouizerat, B.E. Jr., Miaskowski, C., Lillicrap, D.P. (2007)

Theories of Blood Coagulation

J Pediatr Oncol Nurs 24(3): 123-131

Rosen, S., Casoni, M.C. (2002)

Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: Comparison between methods.

Am Clin Lab 21(3): 32-37

Rote Liste (2006) Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt/Main

Rusconi, C.P., Yeh, A., Lyerly, H.K., Lawson, J.H., Sullenger, B.A. (2000)

Blocking the initiation of coagulation by RNA aptamers to factor VIIa.

Thromb Haemost 84(5): 841-848

Rusconi, C.P., Scardino, E., Layer, J., Pitoc, G.A., Ortel, T.L., Monroe, D., Sullenger, B.A. (2002)

RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa.

Nature 419(6902): 90-94

Rusconi, P.C., Roberts, J.D., Pitoc, G.A., Nimjee, S.M., White, R.R., Quick, G.J.R., Scardino, E., Fay, W.P., Sullenger, B.A. (2004)

Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo.

Nat Biotechnol 22(11): 1423-1428

Sadler, J.E., Budde, U., Eikenboom, J.C., Favaloro, E.J., Hill, F.G., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C.A., Lillicrap, D., Mannucci, P.M., Mazurier, C., Meyer, D., Nichols, W.L., Nishino, M., Peake, I.R., Rodeghiero, F., Schneppenheim, R., Ruggeri, Z.M., Srivastava, A., Montgomery, R.R., Federici, A.B., the Working Party on von Willebrand Disease Classification. (2006)

Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.

J Thromb Haemost 4(10): 2103-2114

Saenko, E.L., Ananyeva, N.M., Shima, M., Hauser, C.A.E., Pipes, S.W. (2003)

The future of recombinant coagulation factors.

J Thromb Haemost 1(5): 922-930

Saenko, E., Josic, D., Stadler, M., Sarafanov, A., Lim, Y.P., Shima, M., Ananyeva, N., Schwinn, H. (2001)

Molecular Modifications in Factor VIII Concentrates Produced from Different Plasma Pools.

Thromb Res 101(6): 501-511

Saenko, E.L., Shima, M., Sarafanov, A.G. (1999)

Role of Activation of Coagulation Factor VIII in Interaction with vWf, Phospholipid, and Functioning within the Factor Xase Complex.

Trends Cardiovasc Med 9 (7): 185-192

Sandberg, H., Almstedt, A., Brandt, J., Gray, E., Holmquist, L., Oswaldsson, U., Sebring, S., Mikaelsson, M. (2001)

Structural and Functional Characteristics of the B-domain-deleted Recombinant Factor VIII Protein, r-VIII SQ.

Thromb Haemost 85: 93-100

Schlachterman, A., Schuetterumpf, J., Liu, J.-H., Freguia, C.F., Tosco, R., Poncz, M., Camire, R.M., Arruda, V.R. (2005)

Factor V Leiden improves in vivo hemostasis in murine hemophilia models.

J. Thromb Haemost 3(12): 2730-2737

Shen, B.W., Spiegel, P.C., Chang, C.H., Huh, J.W., Lee, J.S., Kim, J., Kim, Y.H., Stoddard, B.L. (2008)

The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII.

Blood 111(3): 1240-1247

Spronk, H.M.H., Govers-Riemschlag, J.W.P., ten Cate, H. (2003)

The blood coagulation system as a molecular machine.

Bioessays 25(12): 1220-1228

Srivastava, A. (2002)

Dose and response in haemophilia-optimization of factor replacement therapy.

British Journal of Haematology 127:12-25

Sun, Y.H., Tran, S., Norstrom, E.A., Dahlbäck, B. (2004)

Enhanced Rate of Cleavage at Arg-306 and Arg-506 in Coagulation Factor Va by Gla Domain-mutated Human-activated Protein C.

J Biol Chem 279(46): 47528-47535

- Tagariello, G., Zanotto, D., Radossi, P., Sartori, R., Belvini, D., Salviato, R. (2007)
In Vitro Reactivity of Factor VIII Inhibitors With von Willebrand Factor in Different
Commercial Factor VIII Concentrates.
Am J Hematol 82(6): 460-462
- Toole, J.J., Pittman, D.D., Orp, E.C., Murtha, P., Wasley, L.C., Kaufman, R.J. (1986)
A large region (\approx 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant
activity.
Proc Natl Acad Sci USA 83: 5939-5942
- Tuerk, C., Gold, L. (1990)
Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4
DNA polymerase.
Science 249(4968): 505-510
- Ulrich, H., Martins, A.H., Presquero, J.B. (2004)
RNA and DNA Aptamers in Cytomics Analysis.
Curr Protoc Cytom Chapter 7:Unit 7.28
- United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO).(2003).
Guidelines on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other
hereditary bleeding disorders.
Haemophilia 9(1): 1-23
- Van de Wouwer, M., Collen, D., Conway, E.M. (2004)
Thrombomodulin-Protein C-EPCR System: integrated to Regulate Coagulation and
Inflammation.
Arteroscler Thromb Vasc Biol 24(8): 1374-1383
- Van Dieijen, G., Tans, G., Rosing, J., Hemker, C. (1981)
The Role of Phospholipid and Factor VIIIa in the Activation of Bovine Factor X.
J Biol Chem 256(7): 3433-3442
- Varfay, F., Neubergh, J., Jenkins, P.V., Wakabayashi, H., Fay, P.J. (2006)
Role of P1 residues Arg 336 and Arg 562 in the activated-Protein-C-catalysed inactivation of
Factor VIIIa.
Biochem J 396(2): 355-362
- Vlot, A.J., Koppelman, S.J., Bouma, B.N., Sixma, J.J. (1998)
Factor VIII and von Willebrand Factor
Thromb Haemost 79: 456-465

- Weiler, H., Isermann, B.H. (2003)
Thrombomodulin.
J Thromb Haemost 1(7): 1515-1524
- White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., Sullenger, B. (2001)
Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using “Toggle” SELEX.
Mol Ther 4(6): 567-573
- White, R.R., Sullenger, B.A., Rusconi, C.P. (2000)
Developing aptamers into therapeutics.
J Clin Invest 106(8): 929-934
- Yarovaya, G.A., Blokhina, T.B., Neshkova, E.A. (2002)
Contact System. New Concepts on Activation Mechanisms and Bioregulatory Functions.
Biochemistry (Mosc) 67(1): 13-24
- Zhang, B., Kaufman, R.J., Ginsburg, D. (2005)
LMAN1 and MCFD2 Form a Cargo Receptor Complex and Interact with Coagulation Factor VIII in the Early Secretory Pathway.
J Biol Chem 280(27): 25881-25886
- Zhang, Z., Blank, M., Schluesener, H.J. (2004)
Nucleic acid aptamers in human viral disease.
Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 52(5): 307-315
- Zuker, M. (2003)
Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res 31(13): 3406–3415

10. Anhang

10.1. Laborgeräte

Tab.10: eingesetzte Laborgeräte mit Hersteller

| Gerät | Hersteller |
|--|---|
| Gerinnungsanalysator Amax CS 190 Gerinnungsanalysator KC 10 A | Heinrich Amelung GmbH, Lemgo |
| Fluorometer FLx 800 | Bio-Tek Instrument GmbH, Bad Friedrichshall |
| Electra 1400 C | Beckman Coulter, Lexington, USA |

10.2. Chemikalien, Biochemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 11. verwendete Chemikalien und Biochemikalien

| Chemikalien und Biochemikalien | Hersteller |
|--|---|
| FVIII Chromogen PTT-Reagenz Actin FSL FVIII plasma standard | Dade Behring Marburg GmbH, Marburg |
| Humaner FIXa Humaner FX Humanes- Alpha-Thrombin | Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen |
| Fluorogenes Peptidsubstrat für FX: Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC Fluorogenes Peptidsubstrat für FIIa: Z-Gly-Gly-Arg-AMC · HCL | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| r-Hirudin, Refludan | Pharmion Germany GmbH, Hamburg |
| Humanes aktiviertes Protein C: Drotrecogin alpha (Xigris®) | Eli Lilly Australia Pty Limited, West Ryde, Australien |
| Natürliches Faktor VIII-Mangelplasma | Helena Laboratories, Beaumont, USA |

Tab. 12: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| Eppendorf Reagiergefäß 1,5 ml Einmalpipettenspitze 1ml | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| 15 ml Reaktionsgefäß mit Schraubenverschluß 50-ml ml Reaktionsgefäß mit Schraubenverschluß Einmal-Pipettenspitzen 0,5-20 µl Einmal-Pipettenspitzen 21-200 µl Küvetten, Halbmicro | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Einmalpipettenspitzen 0,5 – 10 µl | Axygen Scientific, Union City, USA |

11. Publikationen

Müller, J., Isermann, B., **Dücker, C.**, Salehi, M., Meyer, M., Friedrich, M., Madhusudhan, T., Oldenburg, J., Mayer, G., Pötzsch, B. (2009)

An Exosite-Specific ssDNA Aptamer Inhibits the Anticoagulant Functions of Activated Protein C and Enhances Inhibition by Protein C Inhibitor. **Chem Biol** 16(4): 442-451

12. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Hartmann für die organisatorische Betreuung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. B. Pöttsch danke ich herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas und die fachliche Betreuung der Arbeit.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. J. Müller für seine Hilfsbereitschaft und für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

13. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Bonn, den 10. März 2011

Christina Dücker