

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 HSO2, HSO3, HSO4 und HSO8	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 HSO2-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 verkürzte Varianten auf die APC-vermittelte Inaktivierung von Faktor VIIa	58
4.7.1. Thrombin-vermittelte Aktivierung des Faktor VIII-Konzentrates Recombinate	58
4.7.2. APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIa (Recombine)	60
4.7.3. Intra-Assay-Varianz	60
4.7.4. Einfluß der HS02-Aptamer-Varianten auf die APC-induzierte Inaktivierung von Faktor VIIa	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 VIIa-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 VIIa 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