

Funktionelle Untersuchung der Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katrin Jeannette Czogalla

aus

Mönchengladbach

Bonn, Mai 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 29.11.2013

Erscheinungsjahr: 2014

I wrote this song to save myself,
And now I sing it because I'm saved,

.....

Hey Vitamin K,
Do you even remember my name?

.....

Gruff Rhys, song text "vitamin K"

für meine Eltern
Gerhard und Kazimiera

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Vitamin K.....	5
1.2 Vitamin K-Zyklus	7
1.2.1 Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex Untereinheit 1.....	8
1.2.2 γ -glutamyl-Carboxylase.....	12
1.2.3 NAD(P)H:Chinon-Akzeptor-Oxidoreduktase	12
1.2.4 Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex, Untereinheit 1-like1	13
1.3 Vitamin K-abhängige Proteine	14
1.3.1 Vitamin K-abhängige Blutgerinnungsfaktoren.....	15
1.4 Vitamin K-Antagonisten: Cumarine	17
1.4.1 Quick-Test und INR.....	18
1.4.2 Cumarinresistenz	18
1.5 Messung der VKOR-Aktivität (VKOR-DTT Assay).....	19
1.5.1 Diskrepanz des VKOR-DTT Assay	20
1.6 Zielsetzung und Vorgehen	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	23
2.1.2 Laborgeräte.....	25
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.4 Kommerzielle Anwendungs-Kits	26
2.1.5 Vektoren.....	26
2.1.6 Längenstandards	26
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.8 Enzyme	28
2.1.9 Antikörper.....	28
2.1.10 Verwendetes biologisches Material.....	28
2.1.11 Medien für Bakterienkultur	29
2.1.12 Medien für Zellkultur.....	30
2.1.13 Oligonukleotide	31
2.1.14 Programme	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	32
2.2.1.2 <i>Gezielte Mutagenese</i>	33
2.2.1.3 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	34
2.2.1.4 <i>DNA-Isolation aus Agarosegelen</i>	35
2.2.1.5 <i>Sequenzierung</i>	35
2.2.1.6 <i>Klonierung (restriction free cloning)</i>	37
2.2.1.7 <i>DpnI-Verdau</i>	39
2.2.1.8 <i>Transformation in E.coli</i>	39
2.2.1.9 <i>Plasmid-Präparation</i>	41
2.2.1.10 <i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	41
2.2.1.11 <i>Western Blot</i>	42
2.2.1.12 <i>Bestimmung der FIX-Aktivität</i>	44

2.2.1.13	<i>FIX-Antigen-Bestimmung</i>	44
2.2.2	Zellbiologische Methoden	45
2.2.2.1	<i>Kultivierung von human embryonic kidney Zellen (HEK293T)</i>	45
2.2.2.2	<i>Subkultivierung von HEK293T-Zellen</i>	45
2.2.2.3	<i>Langzeitlagerung von HEK293T-Zellen</i>	45
2.2.2.4	<i>Zellzahlbestimmung</i>	46
2.2.2.5	<i>Transfektion von HEK293T-Zellen</i>	46
2.2.2.6	<i>Kultivierung von Sf9-Zellen</i>	47
2.2.2.7	<i>Subkultivierung von Sf9-Zellen</i>	48
2.2.2.8	<i>Langzeitlagerung von Sf9-Zellen</i>	48
2.2.2.9	<i>Transfektion von Sf9-Zellen</i>	48
2.2.2.10	<i>Virus-Herstellung</i>	49
2.2.2.11	<i>Plaque-Assay</i>	49
2.2.2.12	<i>Bestimmung der FIX-Aktivität transfizierter Zellen</i>	50
2.2.3	Dosis-Wirkungs-Kurve und IC ₅₀ -Berechnung	51
2.2.4	Proteinmodellierung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Etablierung einer neuen Methode zur Messung der VKORC1-Aktivität	53
3.2	Proteinmodellierung	56
3.2.1	Proteinstruktur der humanen VKORC1	56
3.2.2	Warfarin-Bindungsstellen in der VKORC1	58
3.3	Untersuchung cumarinresistenter VKORC1 Mutationen.....	62
3.3.1	Expression der VKORC1-Varianten und des FIX	62
3.3.2	Dosis-Wirkungs-Kurven cumarinresistenter VKORC1-Mutationen ..	66
3.3.2.1	<i>Endogene VKOR-Aktivität in HEK293T-Zellen</i>	66
3.3.2.2	<i>VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche I</i>	67
3.3.2.3	<i>VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche II</i>	68
3.3.2.4	<i>VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche III</i>	71
3.3.2.5	<i>VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche angehören</i>	73
3.3.3	IC ₅₀ -Werte	74
3.4	Untersuchung zur VKORC1-Enzymhemmung.....	77
3.5	Untersuchungen zum Bypass des Vitamin K-Zyklus	78
3.5.1	NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus in HEK293T-Zellen.....	78
3.5.2	Übertragung der neuen Methode auf Insektenzellen.....	79
3.5.2.1	<i>NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus in Sf9-Zellen</i>	81
4	Diskussion	82
4.1	Vor- und Nachteile des neuen VKOR-Assays.....	83
4.1.1	Experimentelle Einflussfaktoren der neuen Methode.....	83
4.1.2	Vergleich zwischen der neuen Methode und dem VKOR-DTT Assay	84
4.1.3	Spezifische VKORC1-Aktivität im neuen Assay.....	86
4.2	Neue Hypothesen zur Warfarinbindung	88
4.2.1	Drei potentielle Warfarinbindungsstellen in der VKORC1	89
4.2.2	Ist das TYA-Motiv für die Warfarinbindung verantwortlich?	89
4.2.3	Bindet Warfarin irreversibel an die VKORC1?	93
4.3	Warfarin resistente VKORC1-Mutationen	95
4.3.1	VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche I.....	95

4.3.2	VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche II	97
4.3.2.1	<i>VKORC1-Mutationen, die die Kontaktfläche II direkt betreffen</i>	97
4.3.2.2	<i>VKORC1-Mutationen, die die Kontaktfläche II indirekt beeinflussen</i> 98	
4.3.3	VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche III	102
4.3.4	VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden können	103
4.4	Der Bypass des Vitamin K-Zyklus	105
4.4.1	Mögliche Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus.....	106
4.4.2	NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme in HEK-Zellen	107
4.4.3	NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme in Insektenzellen	109
5	Fazit und Ausblick	111
	Literaturverzeichnis	112
	Abbildungsverzeichnis	123
	Tabellenverzeichnis	125
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Anhang	128
	A.1 Primersequenzen	128
	A.2 Vektorkarten	133
	Publikationsverzeichnis	136

Zusammenfassung

Seit 1941 werden Cumarine als orale Antikoagulantien in der Therapie venöser und arterieller Thrombosen sowie zur Prävention thromboembolischer Ereignisse bei z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt. Trotz der jahrelangen Erfahrung mit Cumarinen wurde ihr Targetmolekül, die „Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex, Untereinheit 1“ (vitamin K 2,3-epoxide reductase complex, subunit 1; *VKORC1*), erst im Jahr 2004 entdeckt. *VKORC1* reduziert Vitamin K 2,3-Epoxid und Vitamin K-Chinon zur Hydrochinon-Form des Vitamin K. Das Vitamin K-Hydrochinon dient dem Enzym γ -glutamyl-Carboxylase (GGCX) als Substrat um Vitamin K-abhängige Proteine zu γ -carboxylieren, die dadurch ihre biologische Aktivität erhalten. Bei diesem Prozess wird das Vitamin K-Hydrochinon zu Vitamin K 2,3-Epoxid oxidiert, welches wiederum von der *VKORC1* zu Vitamin K-Hydrochinon reduziert werden kann. Die Inhibition der *VKORC1* durch Cumarine (z.B. Warfarin) führt dazu, dass der GGCX kein Vitamin K-Hydrochinon bereitgestellt werden kann. Dadurch werden unter anderem weniger Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren (Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X) γ -carboxyliert und somit die Gerinnung gehemmt. Der molekulare Mechanismus der oralen Antikoagulation und des Vitamin K-Zyklus ist daher seit der Entdeckung der *VKORC1* weitgehend geklärt. Allerdings wurden seither 24 Mutationen in der humanen *VKORC1* (*hVKORC1*) beschrieben die zu einer Cumarinresistenz führen. Warum diese Mutationen zu einer Resistenz führen und welche Strukturen und Regionen in die Cumarinbindung involviert sind, ist weiterhin unklar. Um Fragestellungen bezüglich der Funktion der *VKORC1* zu untersuchen wurde bisher der „klassische“ *VKOR*-DTT Assay genutzt. Jedoch sind die mit diesem Assay generierten Daten in weiten Teilen nicht mit dem klinischen Phänotyp der jeweiligen Patienten vereinbar.

Mit dieser Dissertation wurde eine neue Methode zur Untersuchung cumarinresistenter Mutationen in der *VKORC1* etabliert, deren Ergebnisse die *VKOR*-Funktion korrekt widerspiegeln. Alle 24 bekannten humanen cumarinresistenten *VKORC1*-Varianten zeigen mit dieser Methode eine Resistenz gegenüber Warfarin, die zudem mit dem Patientenphänotyp übereinstimmt. Damit stellt der neue Assay eine erhebliche Verbesserung im Vergleich zum „klassischen“

VKOR-DTT Assay dar, indem dieselben *VKORC1*-Mutationen größtenteils keine Resistenz zeigen und daher nicht mit dem Patientenphänotyp korrelieren. Die in der neuen Methode generierten Daten, berechnet als IC_{50} -Werte (mittlere inhibitorische Konzentration), erlauben es die jeweiligen Mutationen in milde, mittlere und komplette Resistenzgrade einzuteilen. Zudem kann der Wert des Quotienten aus der jeweiligen IC_{50} Variante / IC_{50} wt als erster Anhaltspunkt für den erhöhten Cumarin-Bedarf für die Therapie von Patienten, die die Mutation tragen genutzt werden. Um den Mechanismus der Warfarininhibition und die Auswirkungen der Mutationen besser charakterisieren zu können, wurde anhand der bekannten Kristallstruktur eines bakteriellen VKOR-Homolog ein Proteinmodell für die hVKORC1 erstellt. Zusätzlich wurde an diesem Modell die Bindung von Warfarin simuliert. Die Simulation ergab drei Warfarin-Kontaktflächen in der hVKORC1, die die 3_{10} -Helix des ER-luminalen Loops sowie periplasmatische Anteile der ersten und vierten Transmembrandomäne der hVKORC1 betreffen. Nahezu alle Mutationen, die zu einer Cumarinresistenz führen, sind in oder um eine dieser ermittelten Kontaktflächen lokalisiert. Durch die Interaktion von Warfarin mit den Kontaktflächen der hVKORC1 wird der inter- und/oder intramolekulare Elektronentransfer blockiert und/oder der Eintritt des Vitamin K verhindert. Zudem zeigten weitere Experimente mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin K und Warfarin, dass entgegengesetzt der bisherigen Meinung, Cumarine binden irreversibel an die VKORC1, Warfarin wahrscheinlich ein kompetitiver Inhibitor ist.

Summary

Since 1941 coumarins are used as oral anticoagulants for therapy of venous and arterial thrombosis and especially for prevention of thrombotic events in cardiovascular diseases. Despite the long lasting experience of coumarins, the discovery of their molecular target, the enzyme vitamin K oxidoreductase complex subunit 1 (VKORC1) took until 2004. VKORC1 reduces vitamin K 2,3-epoxide and vitamin K-quinone to the it's hydroquinone form. Further, vitamin K hydroquinone is used as substrate by the enzyme γ -glutamyl-carboxylase (GGCX) to activate all vitamin K dependent proteins by γ -carboxylation. In this process, vitamin K 2,3-epoxide is generated as a by-product and again is reduced to vitamin K-quinone and further to vitamin K hydroquinone by VKORC1. Inhibition of VKORC1 by coumarins (e.g. warfarin) results in decreased VKOR activity and consequently GGCX lacks its substrate (vitamin K hydroquinone). Therefore, all vitamin K dependent coagulation factors (e.g. factor II, factor VII, factor IX, factor X) stay under-carboxylated and remain inactive. Thus, the molecular mechanism of oral anticoagulation and the vitamin K cycle was clarified by the discovery of *VKORC1*. However, in current literature there are 24 different mutations reported from the human *VKORC1* (*hVKORC1*) gene that are associated with oral anticoagulant resistance. But the mechanism of coumarin binding to VKORC1 and how mutations in *VKORC1* lead to coumarin resistance is still unclear. Initial investigations on mutant *hVKORC1* which used the "classical" DTT-driven VKOR assay to evaluate VKORC1 function, showed large discrepancies between *in vitro* and *in vivo* phenotypes.

In this PhD thesis a new assay was developed for evaluating the functional activity of *VKORC1* variants that corresponds well to the patient phenotype. In contrast to the "classical" DTT-driven VKOR assay, all 24 known human *VKORC1* mutations exhibit warfarin resistance and reflect patient phenotype well. Furthermore, the present *in vitro* expression analysis allows us to classify the mutations into mild, moderate or complete resistance phenotype categories. In addition, the calculated mutant:wild type IC₅₀ ratios give a rough approximation for the increased dose requirements for the respective oral anticoagulant resistant patient. In order to gain further structural insights into the impact of these mutations on warfarin binding, we have generated a

homology based model of hVKORC1. Using *in silico* docking on this model, we propose three putative warfarin binding interfaces in hVKORC1 (warfarin binding interface I-III), which cover the ER-luminal loop and the first as well as the fourth transmembrane domain. Almost all hVKORC1 mutations are located in one of these interfaces or affect them by inducing local conformational changes. Based on these data, we conclude that warfarin inhibits hVKORC1 by blocking the inter- and/or intramolecular electron transfer and/or by occupying the binding pocket and physically excluding vitamin K. In addition, contrary to the previous opinion that warfarin binds irreversibly to VKORC1, we conclude from our experiments with different concentrations of vitamin K and warfarin, that warfarin is a competitive inhibitor of VKORC1.

1 Einleitung

Cumarine werden bereits seit 1941 als orale Antikoagulation eingesetzt und gehören weltweit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten. Ihr Einsatz ist vielfältig und reicht von der Therapie venöser und arterieller Thrombosen bis hin zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse bei Herz-Kreislauf Erkrankungen.^[1] Aufgrund vieler pharmakokinetischer sowie pharmakogenetischer Interaktionen ist die Medikation mit Cumarinen (z.B. Warfarin) schwierig, insbesondere wegen des engen therapeutischen Fensters und der daraus resultierenden Gefahr von Blutungen und Rethrombosen.

Erst seit der Entdeckung der „Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex Untereinheit 1“ (vitamin K 2,3-epoxide reductase complex, subunit 1; *VKORC1*) im Jahre 2004 ist der molekulare Mechanismus der Cumarin-basierten oralen Antikoagulation weitgehend aufgeklärt.^[2,3] Die Inhibition der *VKORC1*, dem Targetmolekül der Cumarine, führt dazu, dass alle Vitamin K-abhängigen Proteine inaktiv bleiben, so dass u.a. eine erniedrigte spezifische Aktivität der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren erzielt wird. In seltenen Fällen können jedoch Mutationen in der *VKORC1* Cumarinresistenzen verursachen und die Therapie mit Cumarinen zusätzlich erschweren oder sogar unmöglich machen.^[2,4]

1.1 Vitamin K

Bereits im Jahr 1935 untersuchte Henrik Dam Mangelkrankungen bei Hühnern die durch fett- und cholesterinfreie Ernährung bedingt waren. Dabei zeigten die Tiere nach Fütterung mit Chloroform-extrahiertem Futter große subkutane sowie intramuskuläre Blutungen. Auch die Zufütterungen der damals bekannten fettlöslichen Vitamine A, D und E konnten die Mangelkrankung nicht beheben. Daher kam er zu dem Schluss, dass das Fehlen eines bis dahin unbekanntes, weiteren fettlöslichen Vitamins für die Koagulopathie verantwortlich sein musste. Henrik Dam nannte das aus dem Chloroformextrakt gewonnene gelbliche Vitamin aufgrund seiner „*koagulatorischen*“ Eigenschaften Vitamin K („Koagulation“ sowohl im Skandinavischen als auch im Deutschen).^[5]

Seit seiner Entdeckung fand Vitamin K schnellen Einsatz in der Medizin, obwohl der Mechanismus seiner prokoagulatorischen Wirkung zu diesem Zeitpunkt unbekannt war. Bis heute erhalten Neugeborene prophylaktisch Vitamin K um postpartale Blutungen aufgrund Vitamin K-armer Muttermilch und Leberunreife zu vermeiden.^[6,7]

Die K-Vitamine sind essentiell und für die posttranslationale Modifikation von Vitamin K-abhängigen Proteinen notwendig. Sie gehören mit den Vitaminen A, D und E zu der Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Alle K-Vitamine besitzen eine 2-Methyl-1,4-Naphthochinon-Struktur, die sich durch die Substitution am C3-Kohlenstoff-Atom unterscheidet.

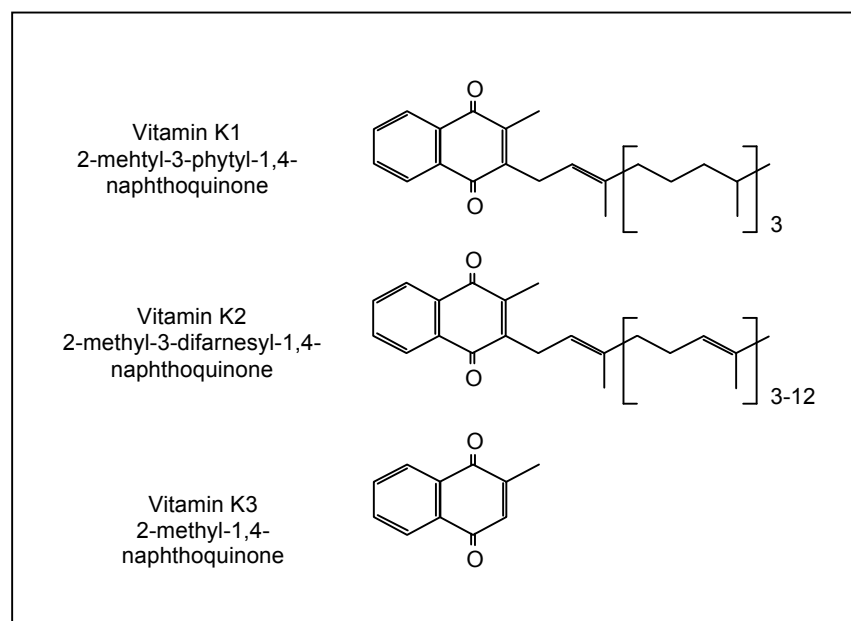


Abb. 1.1: Die K-Vitamine.

Alle K-Vitamine besitzen eine 2-Methyl-1,4-Naphthochinon-Struktur und unterscheiden sich nur in ihrer Substitution am C3-Kohlenstoff. Das Vitamin K₁ besitzt eine Phytylseitenkette, das Vitamin K₂ eine variable Anzahl von 4-13 Isopreneinheiten und das Vitamin K₃ ein Wasserstoffatom.

Vitamin K₁ (Phyllochinon) besitzt eine größtenteils gesättigte, aus 20 Kohlenwasserstoffen bestehende Phytyl-Seitenkette und ist in der humanen Leber die vorherrschende Vitamin K-Form.^[8] Die Seitenkette des Vitamin K₂ (Menachinon) besteht aus 4-13 ungesättigten Isopren-Einheiten.^[9] Das synthetisch hergestellte Vitamin K₃ (Menadion) besitzt als Substituenden am C3-Kohlenstoff lediglich ein Wasserstoffatom.

1.2 Vitamin K-Zyklus

Bereits 1970 zeigten Matschiner und Bell, dass Vitamin K 2,3-Epoxid (VKO) ein Warfarin-induzierter Metabolit von Vitamin K ist.^[10] Weiter stellten sie fest, dass VKO wie Vitamin K prokoagulatorische Aktivität besitzt, die ebenfalls durch Warfarin gehemmt werden kann.^[11] Auf Grund dieser Beobachtungen stellten sie als Erste die Hypothese auf, dass es eine zyklische Umformung von Vitamin K gibt, bei der Blutgerinnungsfaktoren aktiviert werden. Sie nannten die zyklische Konversion von Vitamin K zu Vitamin K 2,3-Epoxid und wieder zurück zum Vitamin K „Vitamin K-Zyklus“ und das verantwortliche Enzym „Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase“ (VKOR).^[12] Das *VKORC1*-Gen wurde jedoch erst im Jahre 2004 entdeckt.^[2,3]

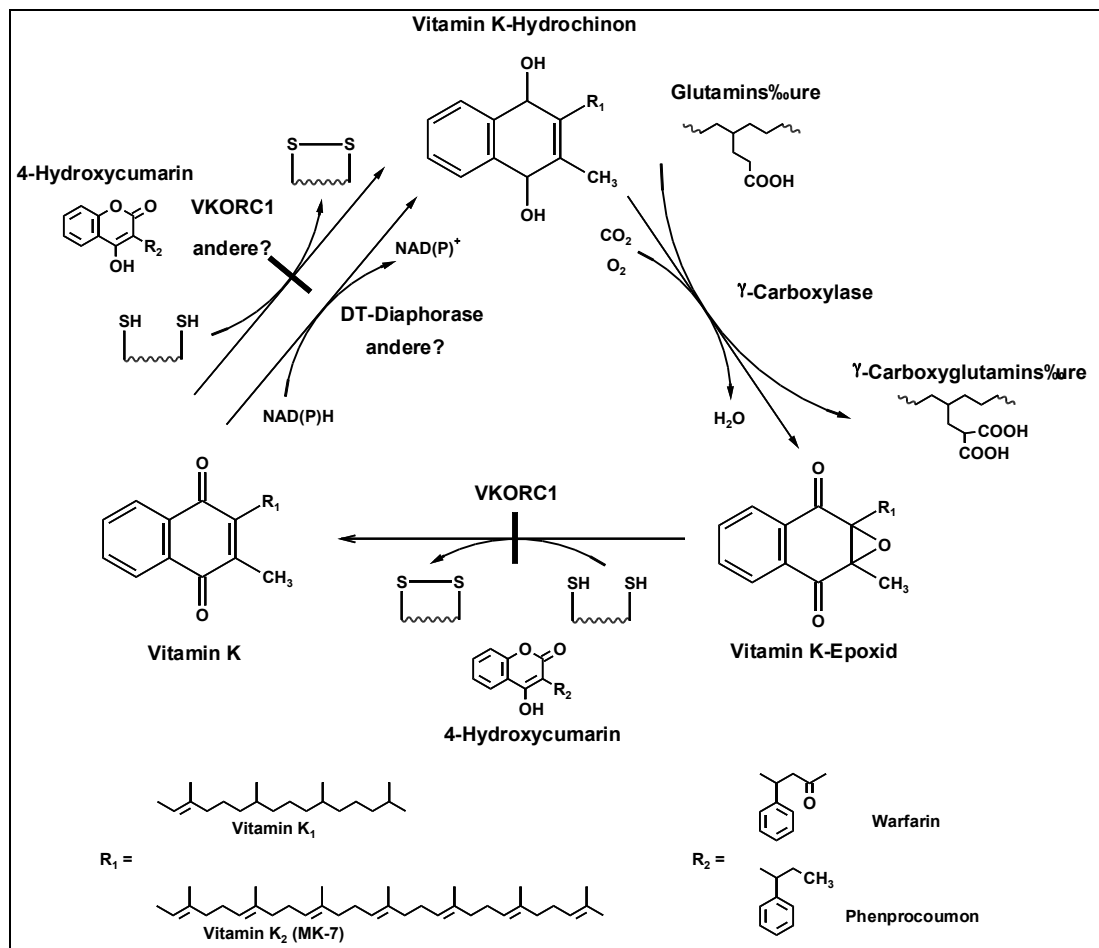


Abb. 1.2: Der Vitamin K-Zyklus.

VKORC1 katalysiert die Reduktion von Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon, das der γ -glutamyl-Carboxylase (GGCX) als Substrat dient. GGCX ist dann in der Lage VKD-Proteine zu γ -carboxylieren, die dadurch ihre biologische Aktivität erhalten. Dabei entsteht Vitamin K 2,3-Epoxid, das durch die VKORC1 über Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon reduziert wird und somit wieder als Substrat der GGCX zur Verfügung steht (entnommen aus Oldenburg *et al.* 2006).

Heute ist bestätigt, dass der Vitamin K-Zyklus dem Recycling von Vitamin K und der damit verbundenen Aktivierung aller Vitamin K-abhängigen Proteine (VKD-Proteine) dient – nicht nur der der Blutgerinnungsfaktoren.

Vitamin K 2,3-Epoxid sowie das Chinon werden durch das Enzym VKORC1 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) reduziert (Abb 1.2). Es entsteht Vitamin K-Hydrochinon (VKH₂), das dem Enzym γ -glutamyl-Carboxylase (GGCX) als Substrat dient. Nur wenn ausreichend VKH₂ zur Verfügung steht, ist GGCX in der Lage, Vitamin K-abhängige Proteine posttranslational zu modifizieren. VKD-Proteine erhalten ausschließlich über die γ -Carboxylierung der GGCX ihre biologische Aktivität. Während dieses Prozesses wird das VKH₂ oxidiert und es entsteht Vitamin K 2,3-Epoxid. Das Epoxid kann abermals von der VKORC1 zum Chinon und weiter zu VKH₂ reduziert werden und schließlich als Substrat für die GGCX dienen. Die ständige zyklische Konversion von Vitamin K durch VKORC1 und die gleichzeitige Aktivierung von VKD-Proteinen durch die GGCX ist heute bekannt unter dem Namen „Vitamin K-Zyklus“.

Cumarine können den Vitamin K-Zyklus direkt über die VKORC1 inhibieren. Die Konsequenz ist, dass die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (FII, FVII, FIX und FX, Protein C, S und Z) in Abhängigkeit von der Cumarindosis in geringerem Maß bis gar nicht γ -carboxyliert werden.

1.2.1 Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex Untereinheit 1

Erst im Jahr 2004 wurde das Gen der „Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex Untereinheit 1“ (*VKORC1*) von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert (NM_024006).^[2,3]

Die Arbeitsgruppe um Oldenburg fand Hinweise auf einen VKOR-Defekt in einer konsanguinen Familie mit acht Kindern. Zwei der acht Kinder verstarben bereits im ersten Lebensjahr an intracerebralen Blutungen, weitere vier Kinder zeigten Blutungsereignisse aufgrund einer Verminderung aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (FII, FVII, FIX, und FX, Protein C und S).^[13] Dieser Phänotyp ist als VKCFD (Vitamin K Clotting Factor Deficiency) bekannt und kann entweder durch Mutationen in der γ -Carboxylase (VKCFD1) oder durch einen Defekt in der Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase (VKCFD2) verursacht werden, deren Gen bis dahin unbekannt

war. Orale Gaben von Vitamin K führten bei den Patienten zu einer weitgehenden Normalisierung der Gerinnungswerte, aber gleichzeitig zu einem Anstieg des Vitamin K 2,3-Epoxid-Spiegels im Serum. Da bei VKCFD1-Patienten der Vitamin K 2,3-Epoxid-Spiegel nicht steigt und in dieser Familie Mutationen in der *GGCX* ausgeschlossen werden konnten, ging man davon aus, dass ein Defekt in der *VKOR* Ursache des VKCFD-Phänotyps sein musste.^[14] Daher wurde zuerst eine genomweite Homozygotie-Kopplungsanalyse durchgeführt, die eine Kandidatenregion auf Chromosom 16 identifizierte.^[15] Schließlich konnte eine Mutation in einem Gen gefunden werden, dessen rekombinant exprimierte wildtyp (wt) cDNA *VKOR*-Aktivität zeigte und durch Warfarin inhibierbar war.^[2] Das Protein wurde „vitamin k 2,3-epoxide reductase complex subunit 1“ genannt, da damals davon ausgegangen wurde, dass die *VKORC1* aufgrund der Komplexität des Vitamin K-Zyklus Bestandteil eines großen Multienzymkomplexes sein musste.

Parallel wurde die *VKORC1* von einer anderen Arbeitsgruppe über siRNA-Experimente („small interfering RNA“) identifiziert. Der Knock-down in A549 Zellen, die eine hohe endogene *VKOR*-Aktivität besitzen, zeigte bei einem Kandidatengen eine signifikante Reduktion in der *VKOR*-Aktivität, so dass man davon ausging, dass es sich bei diesem Gen um die *VKORC1* handelt.^[3]

Die *VKORC1* ist ein 163 Aminosäuren langes membranständiges ER-Protein und ist auf Chromosom 16 des humanen Genoms lokalisiert.^[2] Sequenzvergleiche ergaben, dass die *VKORC1* einer großen Familie von homologen Genen angehört, die in Vertebraten, Insekten, Pflanzen, Archeae und Bakterien gefunden wurden. Alle Orthologen besitzen ein CXXC-Motiv, welches für die Redoxfunktion notwendig ist.^[3,13]

Seit 2010 wird aufgrund der geklärten Kristallstruktur des bakteriellen *VKOR*-Homolog aus *Synechococcus sp.* davon ausgegangen, dass die humane *VKORC1* ein 4-Transmembranprotein mit einer großen ER-luminalen Schleife („Loop“) ist (Abb. 1.3).^[16]

1. Einleitung

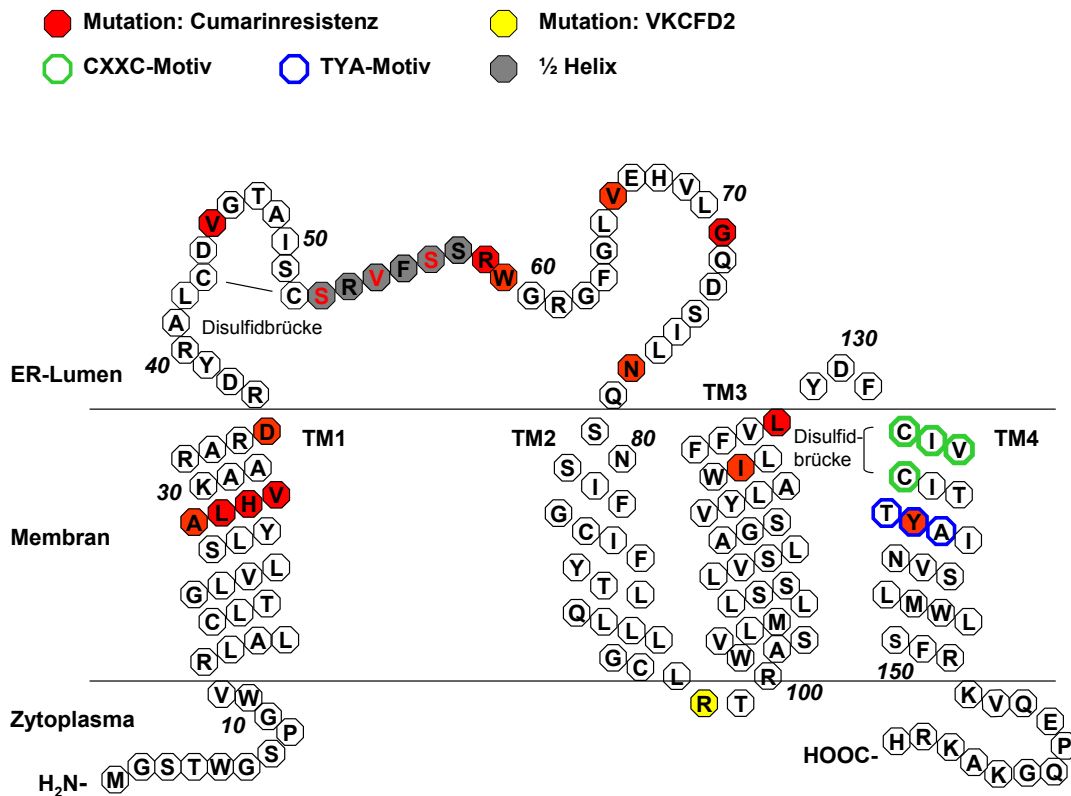


Abb. 1.3: Topologie der humanen VKORC1.

Die VKORC1 besitzt vier Transmembranhelices mit einem großen ER-luminalen Loop. Das aktive Zentrum (CXXC-Motiv, grün markiert) sowie das für die Warfarinbindung zuständige TYA-Motiv (blau markiert) befinden sich in der vierten Transmembrandomäne. Weitere wichtige Strukturen sind die 1/2-Helix (grau hinterlegt) sowie der „Anker“ an der Stelle Trp59. Rot markiert sind die Aminosäuren, deren Austausch zu einer Cumarinresistenz führen. Die Mutation Arg98Trp, die einen VKCFD2-Phänotyp verursacht, ist gelb hervorgehoben.

Das aktive Zentrum (CXXC-Motiv) mit den konservierten Cysteinen an Position 132 und 135 befindet sich in der vierten Transmembranhelix (TM4). Die beiden Cysteine sind für die Reduktion des Substrates essentiell und führen bei einem Aminosäureaustausch zu Alanin oder Serin zu einem kompletten Aktivitätsverlust.^[13,17,18] Des Weiteren befindet sich in TM4 das hydrophobe TYA-Motiv (Threonin-Tyrosin-Alanin). In der NAD(P)H: Chinon-Akzeptor-Oxidoreduktase 1 (NQO1), die *in vitro* in der Lage ist, Vitamin K zu reduzieren und wie die VKORC1 cumarinsensitiv ist, wurde mittels Photoaffinitätsmarkierung und Mutagenese ein Tyrosin (Tyr128) im TYA-Motiv identifiziert, welches wichtig für die Dicumarolbindung ist.^[19] In Ratten treten in der *VKORC1* an der Stelle Tyr139 des TYA-Motivs häufig Mutationen auf, die zu einer Warfarinresistenz führen.^[20] VKOR-Aktivitätsmessungen (mittels VKOR-DTT Assay) zeigten für die Mutation Tyr139Phe eine komplette Resistenz, die Mutationen Tyr139Cys und Tyr139Ser eine mittlere

1. Einleitung

Resistenz. Aufgrund des TYA-Motivs der NQO1 als mögliche Dicumarol-bindungsstelle wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch Tyr139 im TYA-Motiv der VKORC1 wichtig für die Cumarinbindung sein muss.^[20]

Der große ER-lumenale Loop zwischen der ersten und zweiten Transmembranhelix (TM1 und TM2) besteht aus einem C-Terminus, einer amphipatischen $\frac{1}{2}$ -Helix und einem N-Terminus (auch $\frac{1}{2}$ -Segment genannt). Die $\frac{1}{2}$ -Helix soll die Funktion eines „Deckels“ haben und das Substrat (Vitamin K 2,3-Epoxid oder -Chinon) während der Reduktion in der Bindungstasche abschirmen. Sie enthält die hochkonservierte Aminosäure Serin an Position 57. Im periplasmatischen Loop befinden sich zudem die zwei konservierten Cysteine Cys43 und Cys51. Die Disulphidbrücke zwischen diesen beiden Cysteinen kann durch mehrere Proteine der Familie der Thioredoxin-like Proteine reduziert werden (z.B. Proteindisulfid-Isomerase 6).^[16]

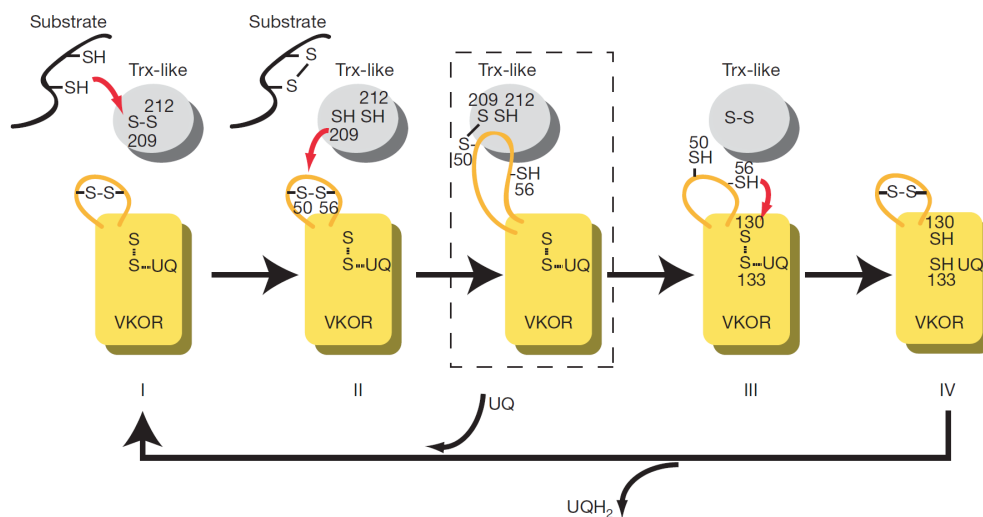


Abb. 1.4: Model des Elektronentransfers.

Die Proteindisulfid-Isomerase katalysiert die oxidative Faltung *de novo* synthetisierter Proteine und stellt der VKORC1 Elektronen bereit. Zuerst werden die Cysteine des Loops reduziert, anschließend die Cysteine des Redoxmotivs, welche dann das Substrat reduzieren (entnommen aus Li *et al.* 2010).

Proteindisulfid-Isomerasen (PDIs) katalysieren die Dithiol-abhängige oxidative Faltung von neu synthetisierten Proteinen im ER. Dabei wird ihr Thioredoxin-Redox-Zentrum reduziert (S-S zu SH-SH) und können anschließend Elektronen für die Reduktion der Loop-Cysteine (Cys43 und Cys51) in der VKORC1 bereitstellen. Es wird spekuliert, dass eventuell auch andere Proteine in der Lage sind, diese Cysteine zu reduzieren, da sonst die VKORC1 stark von der *de novo*-Synthese von Proteinen abhängig sein würde.^[16] Sobald Cys51 reduziert ist, muss die $\frac{1}{2}$ -Helix in die

räumliche Nähe des CXXC-Motivs in der vierten Transmembranhelix gelangen, damit die Elektronen übertragen werden können und die Disulphidbrücke zwischen Cys132 und Cys135 reduziert wird. Dieser Vorgang ist notwendig, da nur das reduzierte CXXC-Motiv das Substrat (Vitamin K 2,3-Epoxid oder –Chinon) weiter reduzieren kann. Nach der Reduktion des Substrates muss abermals eine Bewegung der ½-Helix erfolgen, damit das reduzierte Vitamin K aus der Bindungstasche entlassen werden kann. Es bildet sich wieder eine Disulphidbrücke zwischen den Cysteinen im aktiven Zentrum (Cys132 und Cys135) und ein neuer Zyklus der Elektronenübertragung, in dem Vitamin K reduziert wird, kann beginnen.^[16]

1.2.2 γ -glutamyl-Carboxylase

Die Vitamin K-abhängige γ -glutamyl-Carboxylase (GGCX) ist wie die VKORC1 ein integrales ER-Protein und ist das einzig bekannte Enzym, das Vitamin K-Hydrochinon als Cofaktor benötigt (NM_000821).^[21,22] Unter zusätzlichem Verbrauch von Sauerstoff katalysiert die GGCX die Übertragung von Kohlendioxid auf die Glutamatreste aller VKD-Proteine. Somit hat sie die Funktion einer Carboxylase, die Glutamatreste in γ -Carboxyglutamate umwandelt. Da sie bei diesem Prozess Vitamin K-Hydrochinon zu Vitamin K 2,3-Epoxid oxidiert hat sie gleichzeitig die Funktion einer Epoxidase.^[23]

Die Stöchiometrie von verbrauchtem VKH₂, gebildetem VKO und synthetisiertem γ -Carboxyglutamat (Gla) ist äquimolar.

1.2.3 NAD(P)H:Chinon-Akzeptor-Oxidoreduktase

Die NAD(P)H:Chinon-Akzeptor-Oxidoreduktase (NQO1, oder DT-Diaphorase) ist ein cytosolisches Flavoprotein und katalysiert die Reduktion vieler Chinone (NM_000903).^[24] *In vitro* ist die NQO1 in der Lage Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon zu reduzieren, wobei sie eine wesentlich höhere Affinität zu dem synthetischen Vitamin K₃ als zu den natürlich vorkommenden Vitaminen K₁ und K₂ besitzt. Im Gegensatz zur VKORC1 ist sie nicht in der Lage, Vitamin K 2,3-Epoxid zum Chinon zu reduzieren und ist ebenfalls - wenn auch in geringerem Ausmaß -

cumarinsensitiv.^[25,26] Das Tyr128 im TYA-Motiv der NQO1 ist für die Dicumarolbindung verantwortlich und wurde mittels Photoaffinitätsmarkierung und Mutagenese identifiziert.^[19]

Derzeit geht man davon aus, dass die NQO1 *in vivo* die Reduktion von Vitamin K zu Vitamin K-Hydrochinon als Bypassmechanismus bei unphysiologisch hohen Dosen von Vitamin K katalysiert.^[27] Diese treten z.B. bei therapeutischer Gabe von Vitamin K zur Antagonisierung einer Cumarinvergiftung auf.

1.2.4 Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex, Untereinheit 1-like1

Die „Vitamin K 2,3-Epoxid-Reduktase-Komplex, Untereinheit 1 - like 1“ (VKORC1L1) ist das Isoenzym der VKORC1 und wurde zeitgleich über Sequenz-Homologiesuche identifiziert (NM_173517).^[2] Im VKOR-DTT Assay (siehe Abschnitt 1.5) konnte gezeigt werden, dass die VKORC1L1 wie die VKORC1 in der Lage ist, Vitamin K 2,3-Epoxid sowie das Vitamin K-Chinon zu reduzieren.^[28] Dabei hat die VKORC1L1 jedoch im Vergleich zur VKORC1 eine 2,2 bzw. 7,3 mal geringere Affinität zum Vitamin K₁ (VK₁>VKO) bzw. Vitamin K₂ (VK₂>VKO). Zudem ist die VKORC1L1 weniger warfarinsensitiv als die VKORC1. Bei 5 µM Warfarin wird die VKORC1 zu 52,9%, die VKORC1L1 nur zu 29,2% inhibiert.^[28] Obwohl die VKORC1L1 *in vitro* in der Lage ist, Vitamin K 2,3-Epoxid und -Chinon zu reduzieren, geht man davon aus, dass die VKORC1L1 keine Funktion im klassischen Vitamin K-Zyklus hat, in dem VKD-Proteine aktiviert werden. Diese Annahme begründet sich auf der Beobachtung, dass die *VKORC1L1* einen Defekt in der *VKORC1* nicht kompensieren kann, wie er bei Patienten mit VKCFD2 gegeben ist. VKCFD2-Patienten zeigen trotz intakter *VKORC1L1* eine verminderte Aktivität der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine. Durch erhöhte Gaben an Vitamin K (1-3 mg/Tag) können diese Patienten jedoch relativ normale Gerinnungswerte erreichen. Der dafür verantwortliche biologische Mechanismus konnte bisher noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden.

Weitere Untersuchungen mit HEK293T-Zellen, bei denen oxidativer Stress durch H₂O₂-Behandlung induziert wurde, zeigten u.a. eine 5,5 mal höhere VKOR-Aktivität auf Grund einer Erhöhung des *VKORC1L1* mRNA-Levels.^[28] Durch die erhöhte VKORC1L1-Aktivität konnte die zelluläre Protektion vor freien Sauerstoffradikalen durch Vitamin K, Co-Enzym Q10 oder Vitamin E signifikant potenziert werden. Daher

scheint die VKORC1L1 eine Rolle in der zellulären Antioxidation, insbesondere in der Abwehr freier Sauerstoffradikale zu spielen.

1.3 Vitamin K-abhängige Proteine

Vitamin K-abhängige Proteine (vitamin *K*-dependent Protein, VKD-Protein) werden ihrer Struktur und Homologie nach in vier Gruppen unterteilt.^[29] Die erste Gruppe besteht aus den prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und den antikoagulatorischen Proteinen C und Z. In eine weitere Gruppe werden aufgrund ihrer 44%igen Homologie das Zellzyklus-regulierende Protein „growth arrest-specific gene 6“ (Gas6) und das antikoagulatorische Protein S zusammengefasst. Die dritte Gruppe bilden die Proteine Osteocalcin (bone matrix protein, BMP) und Matrix Gla Protein (MGP) welche den Kalziumstoffwechsel regulieren. Zuletzt gehören zwei prolinreiche Gla-Proteine (PRGP1 und PRGP2) und zwei transmembranäre Gla-Proteine (TMG3 und TMG4) einer Gruppe von VKD-Proteinen an, deren Funktion bislang unbekannt ist.^[30,31]

Im Allgemeinen besitzen VKD-Proteine ein Signalpeptid, ein Propeptid, eine GLA-Domäne sowie eine spezifische Proteindomäne.



Abb. 1.5: Allgemeiner Strukturaufbau von VKD-Proteinen.

Charakteristisch ist die GLA-Domäne (GLA) mit 3-13 Glutamatresten je nach VKD-Protein. Weiter bestehen VKD-Proteine aus einer Signalsequenz (SIG), einem Propeptid (PRO) und einer unterschiedlichen Proteindomäne (PD; entnommen aus Berkner and Runge 2004).

Das N-terminale Signalpeptid dient der Fixierung des Proteins in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Nach Abspaltung des Signalpeptids bindet die GGCX an eine γ -Carboxylase-Erkennungsregion in der konservierten Propeptidsequenz und γ -carboxyliert die GLA-Domäne des Proteins.^[32] Durch Unterschiede in der Propeptidsequenz bindet die GGCX mit unterschiedlichen Affinitäten an die VKD-Proteine.^[33] Die für alle VKD-Proteine charakteristische GLA-Domäne besitzt je nach Protein 3-13 Glutamatreste (Glu).^[34,35] Nach vollständiger γ -Carboxylierung der

Glutamatreste wird die Propeptidsequenz im Golgi-Apparat entfernt, so dass die GLA-Domäne den N-Terminus im vollständig prozessierten, biologisch aktiven Protein bildet.

Durch die γ -Carboxylierung erhöht sich die Affinität der VKD-Proteine zu Ca^{2+} -Ionen wodurch Chelatkomplexe gebildet werden. Dadurch ist es den Gerinnungsfaktoren möglich, eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipidmembranen wie z.B. an Thrombozyten einzugehen.^[36-40] Die Funktion der Ca^{2+} -Bindung von MGP ist die Verhinderung von Gewebekalzifizierung, von Osteocalcin die der Kalziumspeicherung in Knochen.^[41,42]

1.3.1 Vitamin K-abhängige Blutgerinnungsfaktoren

Die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren sind für eine intakte sekundäre Hämostase (= plasmatische Gerinnung) unerlässlich. Dabei besitzen Faktor II (Prothrombin), FVII, FIX und FX eine prokoagulatorische Wirkung, Protein C, Protein S und Protein Z eine antikoagulatorische Wirkung.^[43-45]

Die sekundäre Hämostase ist für einen dauerhaften Wundverschluss bei einer Gefäßverletzung verantwortlich. Sie erfolgt über eine kaskadenartige proteolytische Aktivierung der prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren (Zymogenaktivierung), die schließlich zu einer Umwandlung von Fibrinogen zu vernetztem Fibrin führt. Außer Faktor V (FV), Faktor VIII (FVIII) und Fibrinogen sind die Gerinnungsproteine Serinproteasen und aktivieren den nachfolgenden Faktor durch Spaltung in zwei kürzere Peptidketten, die durch Disulphidbrücken verbunden sind und somit das aktive Zentrum freilegen.^[45]

Aktiviert wird die sekundäre Hämostase entweder über das intrinsische oder extrinsische System. Das intrinsische System wird durch die Anlagerung von FXII an negativ geladene Oberflächen (z.B. Kollagenfasern) unter der Mitwirkung von Kallikrein und Kininogen initiiert. Es folgt die nachfolgende Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FXII, FXI und FIX. Das extrinsische System wird durch Thromboplastin aus verletztem subendotheliale Gewebe ausgelöst und bildet einen aktiven Komplex mit FVII. Beide Systeme führen zur Aktivierung des Faktors X (FX), welcher zusammen mit FV Prothrombin zu Thrombin spaltet. Durch eine positive

Rückkopplung der Faktoren VIIIa und IXa wird dieser Prozess beschleunigt. Schließlich spaltet das Thrombin Fibrinogen in Fibrinmonomere, deren rasche Polymerisation zur Bildung eines Thrombus führt. FXIII stabilisiert den Thrombus, indem es kovalente Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren knüpft.^[45,46]

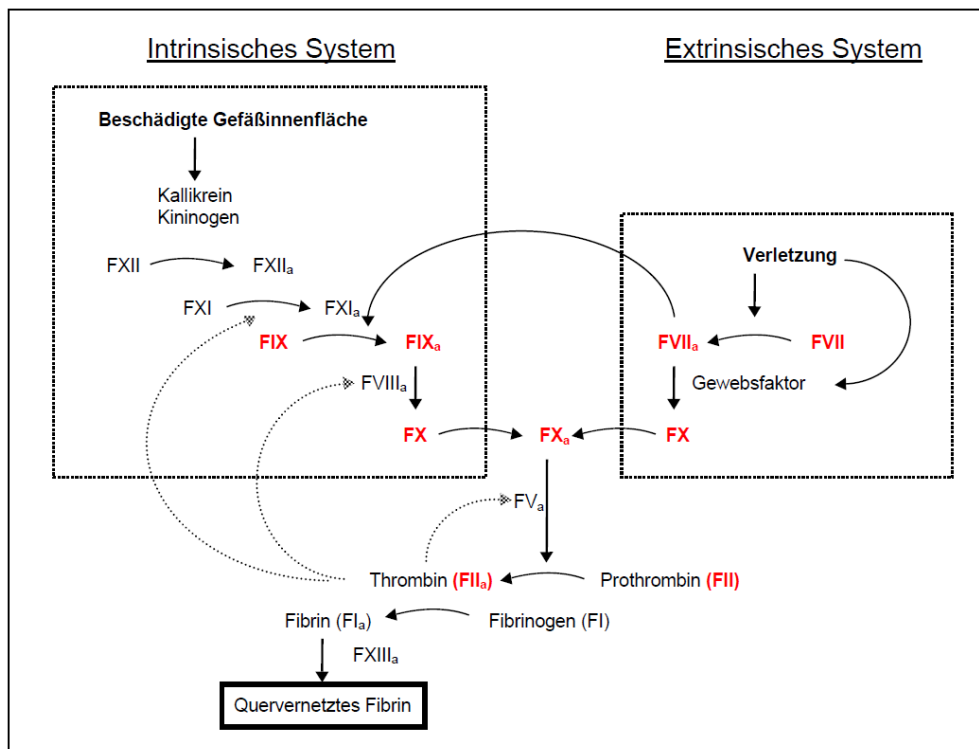


Abb. 1.6: Schema der sekundären Hämostase.

Die intrinsische sowie extrinsische Aktivierung der sekundären Hämostase führen beide zu einer Aktivierung des FX, der schließlich zu einer Vernetzung von Fibrinmonomeren führt. Die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine sind in rot hervorgehoben.

Die antikoagulatorischen VKD-Proteine Protein C, S und Z hemmen die Gerinnung in Abwesenheit von Verletzungen und sind ebenso wie die prokoagulatorischen Gerinnungsproteine für eine intakte Hämostase essentiell. Protein C wird durch die Bindung von Thrombin (FII_a) an Thrombomodulin aus dem Gefäßendothel aktiviert. Der Komplex aus aktiviertem Protein C und Protein S inaktiviert die Gerinnungsfaktoren FV_a und FVIII_a in der freien Blutbahn.^[47] Zusätzlich wird Faktor Xa durch den Protein Z abhängigen Proteaseinhibitor (ZPI) inaktiviert, wobei Protein Z die Affinität des Inhibitors zum FXa vertausendfacht.^[48]

1.4 Vitamin K-Antagonisten: Cumarine

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde bei Rinder-Mastvieh in den USA und Kanada eine bis dahin unbekannte Blutungserkrankung beobachtet. Da das erkrankte Vieh oftmals mit verschimmelter Steinklee-Silage gefüttert wurde (*Melilotus alba* und *M. officinalis*), wurde diese Erkrankung „sweet clover disease“ genannt.^[49] Die ursächliche Substanz mit antikoagulatorischer Wirkung war Dicumarol.^[50] Obwohl der Mechanismus der oralen Antikoagulation derzeit unbekannt war, fand Dicumarol schnellen Einsatz in der Medizin zur Therapie und Prävention venöser sowie arterieller Thrombosen. Im Jahre 1946 wurde das wesentlich wirksamere 3-(2-Acetyl-1-Phenylethyl)-4-Hydroxycoumarin entdeckt und nach seinem Förderer der wissenschaftlichen Forschung „Wisconsin Alumni Research Foundation“ Warfarin benannt. Seit 1948 wird Warfarin erfolgreich als Rodentizid gegen Schädlinge wie Mäuse und Ratten eingesetzt und seit 1954 als orales Antikoagulanz verschrieben. Erst mit der Identifikation der VKORC1, dem Targetmolekül der Cumarine, konnte der Wirkmechanismus der oralen Antikoagulation aufgeklärt werden.^[2,3] Cumarine wirken über eine direkte Inhibition der VKORC1, die dadurch in ihrer Aktivität gehemmt wird. Die Konsequenz ist, dass nicht mehr genügend Substrat (VKH₂) für die GGCX bereitgestellt werden kann. Somit werden weniger VKD-Gerinnungsproteine aktiviert und eine Hemmung der Blutgerinnung erreicht. Eine Langzeittherapie mit Cumarinen kann eine erhöhte Kalzifizierung von Herzklappen und Gefäßen verursachen. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich das untercarboxylierte MGP, welches kein Kalzium binden kann und somit nicht die Gewebekalzifizierungen unterbindet.^[51] In wieweit sich die Unter-carboxylierung über einen langen Zeitraum der restlichen VKD-Proteine z.B. Gas6 auf den Organismus auswirkt, ist bisher noch nicht näher untersucht worden.

Zu den derzeit verwendeten oralen Antikoagulantien gehören vor allem Warfarin, Phenprocoumon und Acenocoumarol. Warfarin wird weltweit und insbesondere in den angelsächsischen Ländern, Phenprocoumon hauptsächlich in Deutschland und deutschsprachigen Ländern (A, CH, aber auch NL), Acenocoumarol in Südeuropa und Südostasien eingesetzt. Die Wirkungsweise der Präparate ist vergleichbar, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Pharmakokinetik (Halbwertszeit Warfarin 30 - 50h, Phenprocoumon 90 - 140h, Acenocoumarol 3 - 11h).^[45]

1.4.1 Quick-Test und INR

Die Cumarintherapie wird mittels der labormedizinischen Parameter Quick-Test und International Normalized Ratio (INR) überwacht. Beim Quick-Test wird durch die Zugabe von Gewebethromboplastin in Blutplasma die exogene Aktivierung der Gerinnungsproteine eingeleitet. Es wird die Zeit bis zum Auftreten von Fibrinfäden gemessen (=Thromboplastinzeit, PT) und im Vergleich zu Norm-Plasma in „Prozent“ gesetzt. Ein Quick-Wert von 100% bedeutet eine normale Gerinnung, ein Wert von z.B. 50% bedeutet eine Verdopplung der Gerinnungszeit.^[45]

Durch den Einsatz verschiedener Gewebethromboplastine sind die Quick-Werte untereinander nicht vergleichbar, so dass die INR zur Standardisierung des Quick-Werts von der World Health Organisation (WHO) eingeführt wurde. Die INR wird mit Hilfe eines Korrekturfaktors errechnet der für das jeweilige zur Quick-Wert-Bestimmung verwendete Gewebethromboplastin spezifisch ist. Sie verhält sich umgekehrt proportional zum Quick-Wert, wobei eine normale INR bei 1,0, eine therapeutische zwischen 2,0 - 3,0 liegt.^[45]

1.4.2 Cumarinresistenz

Die *VKORC1* wurde bei einer konsanguinen Familie identifiziert, deren Kinder eine Verminderung aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren auf Grund einer Mutation in der *VKORC1* aufwiesen (VKCFD2-Phänotyp). Bislang ist im Menschen nur eine Mutation in der *VKORC1* bekannt (Arg98Trp), die zu einer Reduktion der VKOR-Aktivität und somit zu einem VKCFD2-Phänotyp führt.^[2] Die Mutation Arg98Trp ist auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins zwischen TM2 und TM3 lokalisiert.

Neben der Mutation Arg98Trp, die zu einer VKOR-Aktivitätsminderung führt, wurden bisher zusätzlich 24 Mutationen in der humanen *VKORC1* identifiziert, die zu einer Cumarinresistenz führen.^[52] Diese Patienten besitzen keinen VKCFD2-Phänotyp, benötigen jedoch eine höhere Dosis an Cumarinen oder können gar nicht mittels Cumarinen stabil antikoaguliert werden. Die meisten Mutationen, die zu einer

Cumarinresistenz führen, befinden sich im Loop der VKORC1 oder im ER-luminalen Anteil der Transmembranhelices; wobei die meisten in TM1 (sieben Mutationen) lokalisiert sind, zwei in TM3 und eine in TM4 (Abb. 1.3). In TM2 ist keine Mutation bekannt, die zu einer Cumarinresistenz führt.

1.5 Messung der VKOR-Aktivität (VKOR-DTT Assay)

Seit den späten 1970er Jahren wird die VKOR-Aktivität direkt über den VKOR-Dithiothreitol (DTT) Assay gemessen (Abb. 1.7).^[53,54] Bei dieser Methode werden Mikrosomen oder Lysate von mit *VKORC1* cDNA transfizierten Zellen mit Reaktionspuffer, DTT und CaCl_2 versetzt. Durch den Zusatz einer definierten Substratkonzentration von Vitamin K 2,3-Epoxid (VK_1O oder VK_2O) und anschließender Inkubation (60 min, 30°C) kann die Reduktion des Epoxids zum Chinon erfolgen. Optional können zusätzlich definierte Konzentrationen an Warfarin eingesetzt werden um die Inhibierung der VKORC1 zu untersuchen. Gestoppt wird die Reaktion mit Isopropanol/Hexan (3:2 v/v) und als interne Extraktionskontrolle dient das jeweilige Epoxid (VK_2O oder VK_1O), welches nicht als Substrat verwendet wurde. Die in der Hexanphase angereicherten hydrophoben Vitamin K-Derivate werden nach chromatographischer Auftrennung mittels HPLC analysiert. Demnach wird in diesen Assay der Umsatz vom Epoxid zum Chinon gemessen.

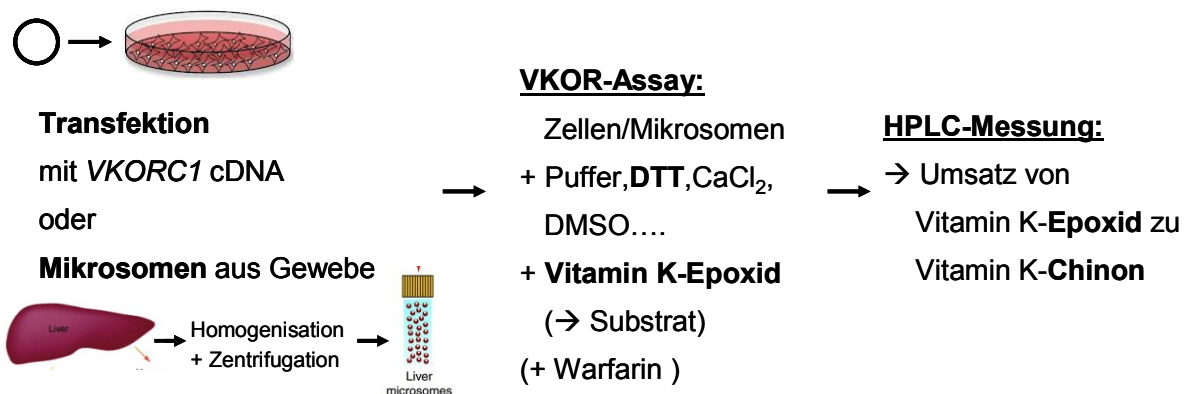


Abb. 1.7: Schema des experimentellen Ablaufs des VKOR-DTT Assay.

Zellen, die mit *VKORC1* cDNA transfiziert wurden oder aus Gewebe hergestellte Mikrosomen werden u.a. mit Puffern, DTT, CaCl_2 und Vitamin K-Epoxid als Substrat versetzt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die Reaktion gestoppt. Die Vitamin K-Derivate werden mittels HPLC aufgetrennt und der Umsatz vom Vitamin K-Epoxid zum -Chinon analysiert.

1.5.1 Diskrepanz des VKOR-DTT Assay

Ein Nachteil des historischen VKOR-DTT Assay ist, dass die Daten der gemessenen *VKORC1*-Mutationen in vielen Fällen nicht mit dem beschriebenen Patienten Phänotyp übereinstimmen. Mit dem VKOR-DTT Assay untersuchte cumarinresistente Mutationen zeigten im Vergleich zur wt *VKORC1* für die Aminosäureaustausche Val45Ala, Arg58Gly und Leu128Arg eine signifikante Erniedrigung in der VKOR-Aktivität (23%, 20,7% und 5,2% Aktivität) und keine Warfarinresistenz.^[2] Diese Mutationen sollten jedoch lediglich eine Resistenz gegenüber Cumarinen aufweisen, d.h. eine normale VKOR-Aktivität besitzen, die im Vergleich zum wt schlechter mit Cumarinen zu inhibieren ist. Auch neuste Arbeiten, in denen alle Mutationen in Hefe (*Pichia pastoris*) exprimiert und anschließend im VKOR-DTT Assay untersucht wurden, zeigen, dass nur vier von 25 untersuchten Mutationen eine Resistenz besitzen.^[55] Die restlichen 19 Mutanten besaßen entweder keine Aktivität, keine Resistenz oder konnten nicht exprimiert werden.

Für die konservierten Cysteine der *VKORC1* wurden im VKOR-DTT Assay ebenfalls unterschiedliche spezifische Aktivitäten ermittelt. Die Cys43Ala- und Cys43Ser-Varianten zeigen 20% bzw. 25% Aktivität im Vergleich zur wt *VKORC1*. Das wahrscheinlich für die Elektronenübertragung essentielle Cys51 besitzt beim Aminosäureaustausch zu Serin 5% VKOR-Aktivität, der Austausch zu Alanin nahezu 100% Aktivität.^[16-18] Weiter zeigen die Cys43Ala-Variante in Kombination mit der Cys51Ala-Variante 112% Aktivität und die Deletion der Region von Cys43 bis Cys51 sogar 85% Aktivität.^[18] Varianten der Cysteine im Redoxmotiv (Cys132 und Cys135) besitzen beim Austausch zu Alanin oder Serin keine Aktivität.^[17,18]

Die unterschiedlichen und zunächst unplausiblen Daten sind wahrscheinlich auf das im Assay verwendete DTT zurückzuführen, welches ein membranpermeables, nicht physiologisches *in vitro* Reduktionsmittel ist. Schon früh war bekannt, dass hohe Konzentrationen an DTT den Assay dahingehend beeinflussen, dass die Inhibierbarkeit durch Warfarin reduziert wird.^[56] Weitere Experimente mit Lebermikrosomen zeigten, dass im klassischen VKOR-Assay statt DTT reduzierte RNase A als Reduktionsmittel verwendet werden kann. Die RNase A getriggerte VKOR-Aktivität konnte zusätzlich durch den PDI-Inhibitor Bacitracin gehemmt

werden. Dies war der erste Hinweis darauf, dass durch die PDI vermittelte oxidative Faltung von *de novo* synthetisierten Proteinen Reduktionsäquivalente für die VKORC1 bereitgestellt werden.^[57] Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Forschergruppe bestätigt, die anstelle des DTTs den VKOR-Assay mit Thioredoxin (Trx) und Thioredoxin-Reduktase (TrxR) durchgeführt haben.^[58] Im Gegensatz zu DTT ist Trx/TrxR ein aus *E.coli* gewonnenes, physiologisches Reduktionsmittel, welches wie die RNase A nicht membrangängig ist. Beim Einsatz von DTT im VKOR-DTT Assay besitzen die Aminosäureaustausche der Loop-Cysteine (Cys43Ala und Cys51Ala) messbare Aktivität. Die Verwendung von Trx/TrxR als Reduktionsmittel zeigen jedoch, dass die VKORC1 ohne diese Cysteine nicht aktiv ist. Dies stützt zum Einen die Annahme, dass die Loop-Cysteine wichtig für den Elektronentransfer und die VKOR-Aktivität sind und zum Anderen, dass die Cysteine des aktiven Zentrums (Cys132 und Cys135) aufgrund der Membranpermeabilität des DTTs direkt reduziert werden können. Somit scheint das DTT im traditionellen Assay in der Lage zu sein, den physiologischen Weg des Elektronentransfers und die natürliche Funktion der VKORC1 zu umgehen.^[58]

Aufgrund der oben beschriebenen ungenügenden Verlässlichkeit der im VKOR-DTT Assay generierten Daten, die nicht mit dem klinischen Phänotyp übereinstimmen, wäre eine alternative Methode zur Messung der VKOR-Aktivität sinnvoll.

1.6 Zielsetzung und Vorgehen

Cumarine sind derzeit immer noch von großer Bedeutung und werden weltweit millionenfach in der Therapie und Prävention von Thrombosen eingesetzt. Mit der Entdeckung der *VKORC1* konnte der molekulare Mechanismus des Vitamin K-Zyklus sowie der oralen Antikoagulation weitgehend geklärt werden. Jedoch sind weiterhin noch viele Fragen ungeklärt, insbesondere in Bezug auf die Cumarinbindung und welche Strukturen und Regionen in der *VKORC1* diese beeinflussen. Mit dem bekannten „klassischen“ *VKOR*-DTT Assay konnten diese Fragen nicht geklärt werden. Zudem sind die mit diesem Assay generierten Daten in weiten Teilen nicht mit dem klinischen Phänotyp von Patienten mit Mutationen in der *VKORC1* vereinbar.

In dieser Arbeit soll daher eine neue Methode zur Messung der *VKOR*-Aktivität etabliert werden, deren Ergebnisse mit dem beschriebenen Phänotyp korrelieren und die *VKOR*-Funktion korrekt widerspiegeln. In diesem System soll, wie unter physiologischen Bedingungen, das prokoagulatorische *VKD*-Gerinnungsprotein Faktor IX als Marker für die *VKOR*-Aktivität dienen. Dafür sollen HEK293T-Zellen mit der cDNA des *hF9* sowie der *hVKORC1* kotransfiziert und mit Vitamin K und verschiedenen Konzentrationen an Warfarin inkubiert werden. Die gemessene FIX-Aktivität soll so die physiologische *VKORC1*-Funktion widerspiegeln.

Des Weiteren sollen alle bekannten humanen *VKORC1*-Mutationen mittels der neu zu entwickelnden zellbasierten Methode charakterisiert werden, um mehr Aufschluss über das Bindungsverhalten von Warfarin an die *VKORC1* zu erhalten. Dabei könnten neue Motive oder Aminosäuren in der *VKORC1* entdeckt werden, die an der Cumarinbindung beteiligt sind.

Schließlich soll ebenfalls mit Hilfe der neuen Methode geklärt werden, ob es im Vitamin K-Zyklus einen physiologischen Bypassmechanismus gibt und ob die *NQO1* und/oder die *VKORC1L1* das dafür verantwortliche Enzym ist.

2 Material und Methoden

Die beschriebenen Versuchsansätze wurden in molekularbiologischen Laboren der Sicherheitsstufe S1 mit der dafür üblichen Ausstattung durchgeführt. Alle Chemikalien wurden in den höchsten Reinheitsgraden bestellt und bei Verwendung spezieller Materialien bzw. Chemikalien wurde gesondert auf den Hersteller bzw. die Bezugsquelle hingewiesen.

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Name	Hersteller
Agar	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Bluo-Gal	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Charcoal-stripped FBS (Kohle gefiltertes FBS)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
dNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
dH ₂ O (Deionisiertes Wasser)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dulbecco's PBS (1x, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
Eisessig	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FBS/Sera plus (Fetales Kälberserum)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
FBS für Insektenzellen	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Glycin	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2. Material und Methoden

Grace´s Insect Medium, supplemented / supplemented (2x) / unsupplemented	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
HiDi Formamid	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
IPTG	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Luminol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
MEM with Earls Salts	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
Owren´s Veronal Puffer	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (Eschborn, Deutschland)
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin 100 x)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
Plasma: Gerinnungsfaktor IX-Mangelplasma, Kontroll-Plasma, Standard-Human-Plasma	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (Eschborn, Deutschland)
Proteaseinhibitor (complete mini)	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
SDS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tetracyclin	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Tris-Tricin SDS Gele, Ladepuffer und Laufpuffer	Bio-Rad (München, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trypton/Pepton	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Vitamin K ₁	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Warfarin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

2.1.2 Laborgeräte

Name	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer Sequenziergerät	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
ANTAES 48/72 Sterilbank	BIOHIT (Rosbach, Deutschland)
Gel Doc XR (Geldokumentation)	Bio-Rad (München, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator (Zellkultur)	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
Electra 1400c Koagulometer	Instrumentation Laboratory (München, Deutschland)
Induce II Inkubator	MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH (Planegg, Deutschland)
Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000)	PeqLab Biotechnology GmbH (Schabach, Deutschland)
Thermocycler (T1, T3, T3000)	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipette (Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Research Mehrkanal 100 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
Waage (PM2000)	Mettler (Gießen, Deutschland)
FluorChem SP	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
15 ml / 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Cellstar 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Kryoröhrchen 2 ml	Corning B.V. Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)
Stripette 5 ml / 10 ml / 25 ml Costar	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Tissue Culture Dish 100 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vivaspin 6 (10.000 MWCO)	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

2.1.4 Kommerzielle Anwendungs-Kits

Name	Hersteller
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Cellfectin II Reagent	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Fugene HD Reagent	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
QIAprep Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep/ Midiprep Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
<i>VisuLize</i> Faktor IX Antigen-Kit	Affinity Biologicals (Ancaster, Kanada)

2.1.5 Vektoren

Die Vektorkarten der jeweiligen Plasmide befinden sich im Anhang A2.

Name	Verwendungszweck	Hersteller
pIRES	Coexpression von VKORC1 und FIX in Säugerzellen	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
pFast Bac	Herstellung von Baculo-Viren	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
pFast BacDual	Herstellung von Baculo-Viren	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
pcDNA3.1/myc-His B	VKORC1 mit Myc-Tag	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

2.1.6 Längenstandards

Name	Hersteller
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.1.7 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer für Agarosegele (4x)	40 % w/v Saccharose 0,1 % w/v Xylencyanol 0,1 % w/v Bromphenolblau auf 100 ml mit TAE-Puffer auffüllen
Dream Taq Puffer (1x)	100 µl 10 x Dream-Puffer 80 µl Nukleotidstammlsg. (Endkonzentration 2,5 mM) 720 µl Aqua. dest
EtOH-Acetat-Lösung	0,1 M NaAc pH 4,6 75 % v/v EtOH
Lösung A	0,1 M Tris-HCl 25 mg Luminol
Lösung B	11 mg Hydroxycumarinsäure in 10 ml DMSO
Nonidet-P40	150 mM NaCl 1% NP-40 / Triton 100 50 mM Tris, pH 8,0
PFU-Puffer (1x)	100 µl 10 x PFU-Puffer 80 µl Nukleotidstammlsg. (Endkonzentration 1,25 mM) 720 µl Aqua. dest
„Stripping“-Puffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 ml Tween 20 pH 2,2 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
TAE (50x)	0,5 M EDTA pH 8,0 2 M Tris 1 M Eisessig Erst EDTA in 100 ml Aqua dest. lösen und pH-Wert einstellen, dann 900 ml mit den anderen Chemikalien versetzen und die Volumina mischen.
TBS (10x)	0,1 M Tris 1,5 M NaCl
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris (pH 8,3) 1,92 M Glycin 1% w/v SDS

2.1.8 Enzyme

Name	Hersteller
Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DpnI	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
iproof DNA Polymerase	Bio-Rad (München, Deutschland)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes/Thermo Scientific (Vantaa, Finnland)
<i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
Shrimp Alkaline Phosphatase-SAP [1 U/μl]	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.1.9 Antikörper

Name	Hersteller
Anti c-Myc (rabbit)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
ERGIC-53 (mouse monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Goat anti-mouse IgG _{2a} -HRP	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)

2.1.10 Verwendetes biologisches Material

Name	Firma/Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α, Library Efficiency DH5α Competent Cells	Invitrogen/Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
HEK293T (human embryonic kidney cells)	DMSZ (Braunschweig, Deutschland)
MAX Efficiency DH10Bac Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen/Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Sf9 cells (<i>Spodoptera frugiperda</i> Zellen)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

2.1.11 Medien für Bakterienkultur

DH5alpha

LB-Medium:

Trypton/Pepton	10 g/L
Bacto Yeast Extract	5 g/L
NaCl	5 g/L

Der Ansatz wird mit Wasser bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf mindestens 50°C werden die entsprechenden Antibiotika in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugeben.

LB-Platten:

Trypton/Pepton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

Der Ansatz wird mit Wasser bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf mindestens 50°C werden die entsprechenden Antibiotika (Endkonzentration 50 µg/ml) zugeben und in Petrischalen gegossen. Die ausgehärteten Platten werden bei 4°C gelagert.

DHBac10

LB-Medium für DHBac10:

Das LB-Medium wird wie zuvor beschrieben angesetzt und folgende Antibiotika nach dem Erkalten hinzugefügt:

50 µg/ml	Kanamycin
7 µg/ml	Gentamycin
10 µg/ml	Tetracyclin

LB-Platten für DHBac10:

Für die Kultivierung und Blau-Weiß Selektion von DHBac10 *E.coli* werden zusätzlich folgende Substanzen hinzugefügt:

50 µg/ml	Kanamycin
7 µg/ml	Gentamycin
10 µg/ml	Tetracyclin
100 µg/ml	Bluo-Gal
40 µg/ml	IPTG

Die Platten sollen im Dunkeln und bei 4°C gelagert werden.

Bakterienstock:

Die Vorkultur (5 ml) wird abzentrifugiert, das Pellet in 730 µl frischem LB-Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführen. Des Weiteren wurde 130 µl Glycerol hinzugefügt und die Glycerolstocks bei -80°C gelagert.

2.1.12 Medien für Zellkultur

HEK293T

Standardmedium:

MEM-Medium	500 ml
FBS	50 ml (10%)
NEAA	5 ml (1%)
Penicillin/ Streptomycin	5 ml (1%)

Transfektionsmedium:

MEM-Medium	500 ml
NEAA	5 ml (1%)

Expressionsmedium:

MEM-Medium	500 ml
FBS (charcoal stripped)	50 ml (10%)
NEAA	5 ml (1%)
Penicillin/ Streptomycin	5 ml (1%)
Vitamin K ₁	5 ng/μl
nach Bedarf Warfarin	0,0 μM – 1 μM

SF9

Standardmedium:

Grace´s Insect Medium, supplemented	500 ml
FBS (für Insektenzellen, Sigma-Aldrich)	50 ml (10%)

Transfektionsmedium:

Grace´s Insect Medium, unsupplemented

Expressionsmedium:

MEM-Medium	500 ml
FBS (charcoal stripped)	50 ml (10%)
Vitamin K ₁	5 ng/μl

2.1.13 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins hergestellt.

Die Primersequenzen befinden sich im Anhang A1.

2.1.14 Programme

- Kaleidagraph 4.04 (Synergy Software, Reading, USA)
- YASARA 12.9.27

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Kary Mullis entwickelte 1983 die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäuren.^[59,60] Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, welche doppelsträngige DNA an ihrem freiem 3'OH-Ende verlängert. Diese Situation kann künstlich durch kurze Oligonukleotide (Primer) erzeugt werden, die komplementär zu einem bestimmten DNA-Abschnitt sind. Zwei Primer (jeweils für den sense- und antisense-Strang) legen somit den Start- sowie Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Stranges fest.

In der Regel besteht jeder PCR-Zyklus aus den drei Schritten Strangtrennung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese. Im ersten Schritt werden die Stränge des ursprünglichen DNA-Moleküls getrennt indem man die den Ansatz für 30 Sekunden zwischen 92-98°C erhitzt („Denaturierung“). Anschließend wird das Reaktionsgemisch schnell auf eine Primer-spezifische Temperatur (zwischen 50-62°C) abgekühlt, damit die Primer mit einem 3'-Ende eines DNA-Stranges hybridisieren können („Annealing“). Schließlich erfolgt die DNA-Synthese bei 72°C, der optimalen Reaktionstemperatur der Taq-DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*), die beide Primer in Richtung der Zielsequenz, von 5' nach 3' verlängert („Elongation“). Die Zielsequenz wird so exponentiell amplifiziert. Im Idealfall entsteht nach n Zyklen die 2ⁿ-fache Produktmenge.

Neben der zu amplifizierenden DNA werden ein Primerpaar („forward“ und „reverse“), alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), eine Pufferlösung, Mg²⁺-Ionen und eine hitzestabile DNA-Polymerase für die Amplifikation benötigt.

<u>PCR-Ansatz:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
24 µl 1x PCR-Puffer	95°C 5 min
je 0,5 µl 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“)	95°C 30 s
0,2 µl Taq - Polymerase	50 - 62°C 30 s
20 - 100 ng DNA	72°C 1 min / kb
	72°C 5 min
	4°C ∞

} 25-30 x

2.2.1.2 Gezielte Mutagenese

Die PCR kann auch dazu genutzt werden, um einen gezielten Nukleotidaustausch in der DNA durchzuführen (engl. site-directed mutagenesis). Dafür werden Mutagenese-Primer benötigt, die die gewünschte Punktmutation in der Mitte tragen, ansonsten aber komplementär zur Zielsequenz und insgesamt mindestens 30 Basenpaare lang sind.^[61]

Für die Mutagenese-PCR wurde die PFU-Polymerase verwendet, welche neben der 5'-3' Polymeraseaktivität auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt. Durch die 3'-5' Exonukleaseaktivität erhält die PFU-Polymerase Korrektur-Eigenschaften (proof reading) mit der falsch eingebaute Nukleotide erkannt und anschließend entfernt werden. Somit arbeitet die PFU-Polymerase genauer aber auch wesentlich langsamer im Vergleich zur herkömmlichen Taq-Polymerase.

<u>PCR-Ansatz:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
23 µl 1x PFU-Puffer	95°C 3 min
je 0,4 µl 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“)	95°C 30 s
0,5 µl PFU - Polymerase	60°C 1 min
1 µl Template (10 ng/µl)	68°C 2 min / kb des Plasmids
	95°C 30 s
	60°C 1 min
	68°C 2 min / kb des Plasmids + 2 min
	4°C ∞

} 15x
 } 15x

Nach der Mutagenese wurde ein *DpnI*-Verdau wie unter 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt.

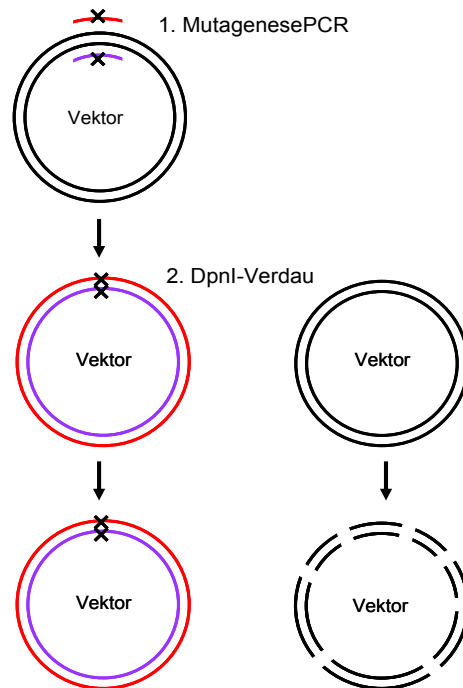


Abb. 2.1: Prinzip der Mutagenese-PCR.

Nach der Denaturierung des Original-Plasmids hybridisieren die Mutagenese-Primer mit dem Plasmid und die Taq-Polymerase beginnt das Plasmid zu amplifizieren. Nach der PCR-Reaktion wird das Original-Plasmid durch die Endonuklease *DpnI* abgebaut, das neu amplifizierte, mutationstragende Plasmid hingegen nicht.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wird an das Agarose-Gel ein elektrisches Feld angelegt und die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladenen DNA-Moleküle wandern zur Anode. Zwischen der Größe der Fragmente und deren zurückgelegter Wegstrecke besteht ein negativ logarithmischer Zusammenhang, so dass eine Auftrennung nach Größe möglich wird. Durch die Agarosekonzentration kann die Porengröße des Gels und somit die Wanderungsfähigkeit der DNA-Moleküle beeinflusst werden. Die aufgetrennte DNA kann schließlich mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der in doppelsträngige DNA interkaliert, durch Bestrahlung mit UV-Licht (254-366 nm) sichtbar gemacht werden.^[62]

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde Agarose 1%ig w/v mit 1 x TAE-Lösung aufgekocht und Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 10 µg/ml). Die DNA-Proben wurden mit 1x Auftragspuffer versetzt und anschließend für 25-35 min bei 150V in 1xTAE-Puffer elektrisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurden je nach Größe des erwarteten PCR-Produkts definierte DNA-Marker verwendet. Die Detektion sowie Dokumentation erfolgte über ein ChemiDoc-System der Firma Biorad.

2.2.1.4 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten können diese gezielt aus Agarosegelen herausgeschnitten und aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich sog. „Megaprimer“ aus Agarosegelen ausgeschnitten und aufgereinigt um diese für restriktionsfreies Klonieren (RF) zu verwenden (Abschnitt 2.2.1.6).

Die Isolation von DNA-Molekülen aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAprep Gel Extraction Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit erfolgte die Sequenzierung mittels der „Kettenabbruchsynthese“ nach Frederick Sanger.^[63] Zuerst wird der Bereich, den man sequenzieren möchte, mittels PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt um überschüssige Primer und dNTPs zu entfernen. Die Sequenzierreaktion erfolgt mit dem aufgereinigten PCR-Produkt, einem einzelnen Primer, dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs (für jede Base ein anderer Fluoreszenzfarbstoff) und einer Taq-Polymerase. Ähnlich wie bei der herkömmlichen PCR läuft die Sequenzierreaktion auch in den Schritten Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung ab. Der Unterschied liegt darin, dass aufgrund der Benutzung nur eines Primers auch nur ein komplementärer Strang während der Reaktion verlängert wird. Zusätzlich wird neben der großen Menge an Desoxy-Nukleotiden (dNTPs), eine kleine Menge an Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs), denen die OH-

Gruppe am 3' C-Atom fehlt, eingesetzt. Nach zufälligem Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs wird der DNA-Strang nicht weiter verlängert, da die DNA-Polymerase das nächste Nukleotid aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe nicht kondensieren kann. Wegen des Abbruchs der Sequenzierreaktion nach Einbau eines ddNTPs wird diese Methode „Kettenabbruchsynthese“ genannt. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit einem spezifisch endständigen fluoreszierendem ddNTP. Über eine Kapillarelektrophorese können diese Fragmente aufgetrennt und der Fluoreszenz-Farbstoff in Abhängigkeit zu der Länge des DNA-Fragments detektiert werden. Schließlich entsteht ein Chromatogramm, welches die Basenabfolge als Abfolge der Fluoreszenzmaxima wiedergibt.

Die Sequenzierreaktion wurde nach folgendem Schema und Temperaturprofil angesetzt:

<u>Sequenzier-Ansatz:</u>	<u>Sequenzier-Programm:</u>
2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid	96°C 1 min
0,5 µl Ready Mix	96°C 10 s
1,5 µl 5 x Sequenzierpuffer	50°C 5 s
0,5 µl 3,2 pmol „forward“ oder „reverse“ Primer	60°C 4 min
6,5 µl Aqua dest.	4°C ∞

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz sofort mittels Ethanol-Acetat Fällung aufgereinigt oder zur späteren Aufreinigung bei -20°C gelagert.

EtOH-Acetat-Fällung und Sequenzierung

Das Sequenzierprodukt wurde mit einer Ethanol-Acetat-Lösung gefällt und mit EtOH gewaschen um überschüssige ddNTPs zu entfernen, die bei der Detektion des Sequenzierproduktes stören würden.

Zu dem Sequenzierprodukt wurden 10 µl Aqua dest., 2 µl Natrium-Acetat (3M, pH 4,6) und 50 µl Ethanol (95%) hinzugefügt und 45 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Zellstoff ausgeklopft und 1 min über Kopf bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 200 µl Ethanol (70%) versetzt und abermals bei 4°C bei 4000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation wiederholt verworfen und die Pellets getrocknet. Zur Analyse mittels eines Kapillarsequenziergeräts wurden die Pellets in 15 µl HiDi-Formamid aufgenommen.

2.2.1.6 Klonierung (restriction free cloning)

Bei der Klonierung wird ein beliebiges DNA-Fragment in einen Vektor integriert. Der Vektor kann z.B. ein Plasmid sein, welches anschließend zur Vermehrung in einen Wirtsorganismus (z.B. *Escherichia coli*) transformiert werden kann.

Die „klassische“ Klonierung nutzt Restriktionsenzyme um das Plasmid zu öffnen. Somit wird das Plasmid linearisiert und besitzt je nach Wahl des Restriktionsenzymes sog. „glatte“ Enden (blunt ends) oder „überhängende“ Enden (sticky ends). Die DNA, die als Insert in den Vektor integrieren soll, sollte möglichst dieselben Enden wie die des offenen Vektors besitzen. Durch eine DNA-Ligase kann das Insert kovalent mit dem Vektor verknüpft werden.

Klonieren ist auch ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und DNA-Ligase möglich. Beim restriktionsfreien Klonieren („restriction free cloning“) wird das gewünschte DNA-Fragment mittels PCR in den Vektor integriert (Abb. 2.2).^[64] Dafür muss das DNA-Fragment Überhänge einer Länge von mindestens 30bp besitzen, die komplementär zu der Stelle im Vektor sind, in der die gewünschte Insertion erfolgen soll. Da das Insert bis zu 3 kb groß sein kann und mit seinen Überhängen die Funktion eines Primers hat, wird es auch „Megaprimer“ genannt. Die Megaprimer werden über PCR generiert und mittels Gelextraktion für den Einsatz in die „restriction free cloning-PCR“ (RF-PCR) aufgereinigt. Prinzipiell funktioniert die RF-PCR wie eine herkömmliche PCR. Der Megaprimer hybridisiert mit dem einzelsträngigen Plasmid und die Taq-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang. Nach der RF-PCR wird ein *DpnI*-Verdau durchgeführt um das ursprüngliche Plasmid ohne Insert zu entfernen.

Mittels RF-Klonierung sind auch Deletionen oder ein kompletter Austausch des Inserts möglich.

2. Material und Methoden

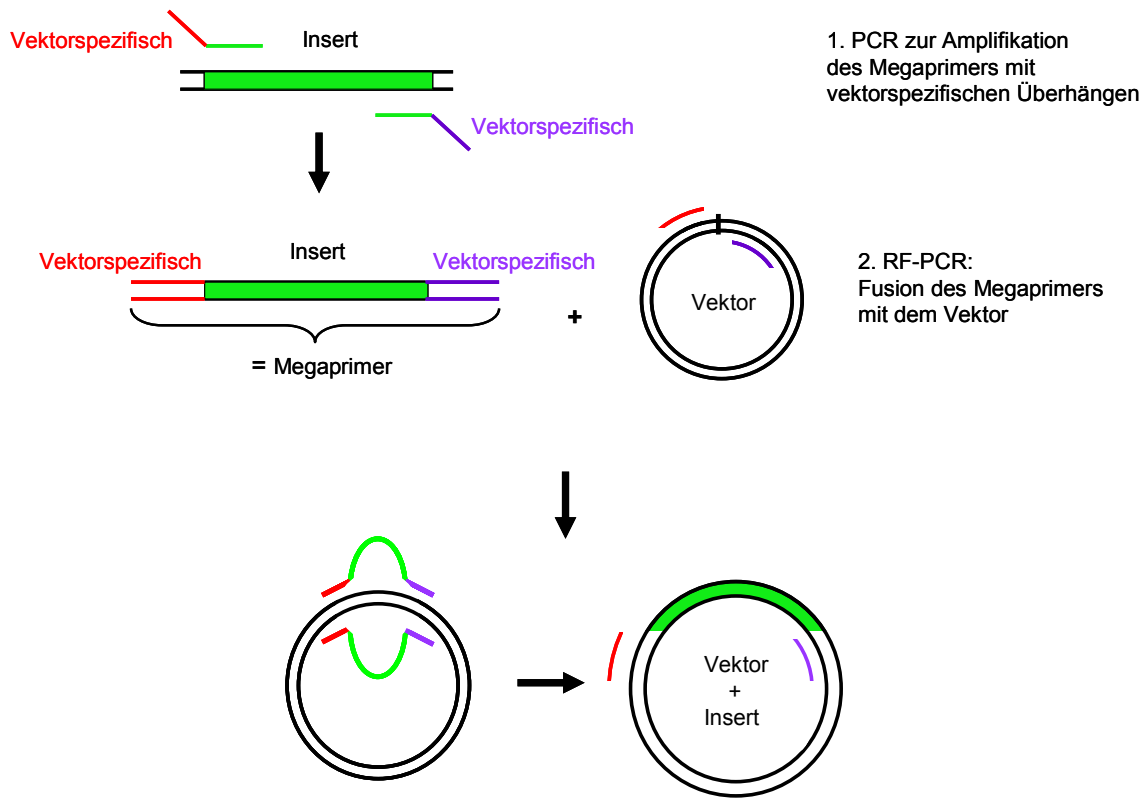


Abb 2.2: Schema zum restriktionsfreiem Klonieren (Restriction free cloning).

In einem ersten PCR-Ansatz wird ein sog. „Megaprimers“ mit Überhängen, die komplementär zum Plasmid sind, amplifiziert. In der zweiten PCR (RF-PCR) bindet der Megaprimers an das Plasmid und die Taq-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang, so dass ein Konstrukt entsteht indem das Insert in den Vektor integriert hat.

Die Megaprimers wurden mittels einer iproof DNA-Polymerase (Bio-Rad) hergestellt:

PCR-Ansatz:

10 µl	HF-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
je 1 µl	20 pmol Primer („forward“ und „reverse“)
1 µl	Template (10 ng)
0,5 µl	iproof DNA - Polymerase
ad 50 µl	Aqua dest.

PCR-Programm:

98°C	30 s	} 30 x
98°C	10 s	
60°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

<u>RF-PCR-Ansatz:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
4 µl Phusion HF-Puffer	98°C 2 min 30 s
1,6 µl dNTPs (2,5 mM)	98°C 30 s
1 µl Megaprimer (50 - 100 ng)	60°C 1 min
0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	72°C 6 min
1,5 µl Vektor (10 ng/µl)	72°C 7 min
11,5 µl Aqua dest.	4°C ∞

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektor-Konstrukte wurden mittels restriktionsfreiem Klonieren („restriction free cloning“) hergestellt.

2.2.1.7 DpnI-Verdau

DpnI ist eine Endonuklease die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an der Sequenz 5´- Gm⁶ATC- 3´ schneidet.

Bakterien methylieren ihre eigene DNA, um sie von Fremd-DNA, die durch Bakteriophagen eingeschleust wurde, zu unterscheiden. Plasmide die in *E.coli* amplifiziert werden, werden ebenfalls vom Bakterium methyliert. Diesen Mechanismus macht man sich nach der Mutagenese zu nutze, um das Original-Plasmid, welches keine Mutation trägt, abzubauen. Die mutagenisierten Plasmide, die mittels PCR generiert wurden, sind nicht methyliert und werden somit nicht von der Endonuklease *DpnI* geschnitten.

In den PCR-Ansatz (20-25 µl, Mutagenese oder RF-Klonierung) wurden 1 µl DpnI hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Transformation in *E.coli*

Plasmide werden zur Vervielfältigung in kompetente Zellen (*E.coli*) transformiert. Eine Selektion erfolgt über Nährböden mit Antibiotikum, auf dem nur *E.coli* wachsen können, die das Plasmid mit entsprechendem Antibiotikum-Resistenzgen aufgenommen haben.

Transformation in One Shot Top10 *E.coli*

Zu den auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen (50 µl) wurden 5 µl des mit *DpnI* verdauten Mutagenese-Ansatzes/RF-Ansatzes gegeben. Nach 30 min Inkubation wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s durchgeführt. Der Ansatz wurde direkt für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend erfolgte eine Zugabe von 200 µl SOC-Medium. Die *E.coli*-Zellen werden für 90 min bei 37°C geschüttelt und abschließend auf einer LB-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation in DH10Bac™ *E.coli*

Die MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells werden für die Produktion rekombinanter Baculoviren benutzt. Die DH10Bac *E.coli* enthalten parentale Bacmid-DNA (baculovirus shuttle vektor bMON14272; 136kb) und das „Helper“-Plasmid pMON7124. Der Baculovirus-Vektor besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen, eine mini-*attTn7*-Sequenz und das *lacZα*-Gen für eine Blau-Weiß-Selektion. Das „Helper“-Plasmid enthält eine *tnsABCD* Region, durch die Proteine exprimiert werden, die für eine Transposition notwendig sind. Das Donor-Plasmid (pFastBac oder pFastBacDual) besitzt Tn7-Elemente, die die multiple cloning site flankieren, ein Gentamicin-Resistenzgen, einen Baculovirus Polyhedron-Promoter und ein SV40 Polyadenylierungs-Signal.

Mit der Transformation des Donor-Plasmids (pFast Bac oder pFast BacDual) in DH10Bac erfolgt eine Transposition, bei der das gewünschte Gen des Donor-Plasmids in das Bacmid integriert. Dies geschieht über die Tn7-Elemente die das gewünschte Gen auf dem Donor-Plasmid flankieren und in die mini-*attTn7*-Sequenz des parentalen Bacmids transpositionieren. Positive Transpositionen in die Bacmid-DNA zeigen sich als weiße Kolonien bei der Blau-Weiß-Selektion.

Mit M13-Primern können positive Transpositionen nachgewiesen und mittels Sequenzierung bestätigt werden. Die rekombinante Bacmid-DNA kann anschließend zur Produktion von infektiösen (nicht human pathogen) rekombinanten Baculoviren in Insektenzellen benutzt werden.

Bei der Transformation von DH10Bac kompetenten Zellen wurden 1 ng (5 µl) des pFastBac1 bzw. pFastBac Dual-Konstrukts (mit gewünschter cDNA) auf die *E.coli* gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gestellt und danach 900 µl SOC Medium hinzugefügt. Die Bakterien wurden für 4 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Schließlich wurden 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnungen angesetzt und jeweils 100 µl auf Agar-Platten, die Kanamycin, Gentamicin, Tetracyclin, BluoGal und IPTG enthielten, ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage im Brutschrank bei 37°C.

Nach zwei Tagen wurden weiße Kolonien gepickt, in LB-Medium hochgezogen und mittels einer PCR mit M13-Primern die Transposition nachgewiesen.

2.2.1.9 Plasmid-Präparation

Die Plasmidpräparation dient der Gewinnung und Aufreinigung von Plasmiden, die in Bakterien vermehrt wurden. Dazu wird eine Bakterienkultur durch alkalische Lyse aufgeschlossen, von Proteinen befreit und die Plasmid-DNA mittels einer Silicagel-Membran vom restlichen Lysat befreit. Schließlich wird die DNA in Wasser eluiert.

Je nach Verwendungszweck wurde das Miniprep oder Midiprep Kit (Qiagen) verwendet. Bakterienlyse und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierten Plasmide wurden in Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrad photometrisch bestimmt.

2.2.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA lässt sich mittels eines UV-Spektralphotometers bestimmen. Da einzel- sowie doppelsträngige Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben, wurde die Messung bei dieser Wellenlänge durchgeführt.

2.2.1.11 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose oder PVDF) übertragen und schließlich über Immundetektion spezifisch nachgewiesen. Somit erhält man unter anderem Informationen über die Größe, Reinheit und die Expressionsmenge eines Proteins.^[65]

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen Western Blot müssen die Proteine zuerst elektrophoretisch nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Nichtkovalente Proteinwechselwirkungen werden durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol oder DTT werden die Disulphidbrücken der Proteine reduziert. Dadurch wird gewährleistet, dass das Laufverhalten der Proteine nur durch ihre Masse bestimmt wird, da ein SDS-Anion zwei Aminosäuren bindet und die negative Ladung, die das Protein dadurch erhält, größer ist als seine Eigenladung.

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden Tris-Tricin Gele verwendet.

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden transfizierte Zellen mit Nonidet-P40 Puffer (mit Proteaseinhibitor) aufgeschlossen. Ungefähr 20 μ g Protein wurden im Verhältnis 1:2 mit Tris-Tricin Ladepuffer, dem 2% β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde vermengt und für 10 min bei RT inkubiert. Als Protein Größen-Standard wurde 5 μ l „Precision Plus Protein Dual Xtra“ verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Tris-Tricin/SDS-Laufpuffer (1x) bei einer Stromstärke von 100V für 60 min.

Proteinblotting

Bei dem Western Blot werden die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen.

Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol und anschließend wie das Whatman-Papier in Laufpuffer eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 60 min auf Eis.

Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C in 5% Milch-TBST inkubiert um freie, unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 60 min bei RT. Nach 3-fachem Waschen mit TBST für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 60 min bei RT. Anschließend wurde die Membran abermals 3 x 5 min mit TBST gewaschen.

Zur Immundetektion wurde 1 ml Lösung A mit 100 µl Lösung B und 1,3 µl H₂O₂ gemischt und auf der Membran verteilt. Die am zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert das in der Detektionslösung vorhandene Luminol. Es entsteht eine Chemilumineszenz, die detektiert werden kann.

Myc-Tag

1. Primärantikörper: Anti c-Myc (rabbit) (1:500 in TBST)
2. Sekundärantikörper: donkey anti rabbit IgG-HRP (1:4000 in TBST)

ERGIC-53

1. Primärantikörper: Anti ERGIC-53 (1:500 in TBST)
2. Sekundärantikörper: goat anti-mouse IgG_{2a}-HRP (1:4000 in TBST)

„Stripping“ von Western Blots

Die PVDF-Membran kann nach der Detektion von den Antikörpern befreit werden um anschließend dieselbe Membran mit anderen Antikörpern zu inkubieren.

Dazu wurde die Membran zweimal für 10 min mit dem „Stripping“-Puffer, 2 x 10 min in PBS und schließlich 2 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Membran wurde über Nacht in 5% Milch-TBST blockiert, 3 x 5 min in TBST gewaschen und danach mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

2.2.1.12 Bestimmung der FIX-Aktivität

Zur Bestimmung der FIX-Aktivität wurden 10 µl der zu messenden Probe mit Mangelplasma vermengt. Das verwendete Mangelplasma enthält alle Gerinnungsfaktoren im Überschuss, bis auf den zu bestimmenden Einzelfaktor (hier FIX), so dass der zu bestimmende Einzelfaktor in der Probe die limitierende Größe ist. Zur Aktivierung der Proben wurde aktiviertes Thromboplastin zugegeben und die Zeit bis zur Fibrinbildung nach Zugabe von Ca^{2+} -Ionen gemessen. Die gemessene Gerinnungsaktivität wird anhand einer Kalibrationskurve von Standardpoolplasma normalisiert und in % angegeben.

Das Standardplasma wird aus einem Citrat-Mischplasma von ausgewählten, gesunden Spendern gewonnen und weist definitionsgemäß eine Aktivität von 100% auf.

2.2.1.13 FIX-Antigen-Bestimmung

Die FIX-Antigen Bestimmung erfolgte mittels eines Enzym-Immunoassays (*VisuLize* Faktor IX Antigen-Kit) mit einem polyklonalen Ziege-Anti-hFIX-Antikörper. Der Nachweisantikörper ist Peroxidase-konjugiert und entwickelt einen blauen Farbstoff durch Zugabe der Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin). Die Reaktion wird durch Säurezugabe abgestoppt und dadurch in einen gelben Farbstoff umgewandelt der photometrisch bei 450 nm gemessen wird.

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers und jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank. Die verwendeten Medien und Puffer wurden vor der Benutzung falls - nicht anders beschrieben - auf die Erhaltungstemperatur der jeweiligen Zelllinie vorgewärmt.

2.2.2.1 Kultivierung von human embryonic kidney Zellen (HEK293T)

Die humane HEK293T-Zelllinie wurde aus einer embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen. Die hypotriploiden Epithelzellen wachsen adhärent bei 37°C unter 5% CO₂ Begasung.

Die dauerhafte Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte mit MEM-Medium, dem 10% FBS zugeführt wurde, sowie 1% NEAA und 1% Penicillin/Streptomycin (=Standardmedium). Ein Nährmediumwechsel erfolgte in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen.

2.2.2.2 Subkultivierung von HEK293T-Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 2 min bei 37°C mit 2 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Die Endopeptidase Trypsin bewirkt ein Ablösen der adhären Zellen durch Spalten der extrazellulären Proteine. Durch Zugabe der doppelten Menge an Medium wird das Trypsin inaktiviert. Nach anschließender Zentrifugation (500 x g, 2 min) wird das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und im gewünschten Passagier-Verhältnis auf die Zellkulturschalen verteilt.

2.2.2.3 Langzeitlagerung von HEK293T-Zellen

Wegen der Gefahr von Kontaminationen und der Dedifferenzierung von Zellen (bei hohen Zell-Passagen) sollten kryokonservierte Zellstocks „junger“ Zellpassagen hergestellt werden um auf diese zurückgreifen zu können.

Dazu wurden die Zellen zuerst mit Trypsin behandelt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Medium, welches zusätzlich DMSO (10%) und FBS (20%) enthielt, resuspendiert und direkt in auf Eis gekühlten Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei -20°C , danach für 24-48 Stunden bei -80°C und schließlich für die Langzeitlagerung im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Zur Reaktivierung der Zellstocks wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort in 8 ml frisches Medium überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung des zellschädigenden DMSO abgenommen, das Zellpellet mit frischem Medium vermengt auf eine Zellkulturschale gegeben.

2.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Damit die Zellen zur Transfektion die nötige Konfluenz von 80-90% erreichen und die Versuche reproduzierbar sind, wurden die Zellen 24 Stunden zuvor mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für 6-well (3,6 cm) Platten wurden 1,1 Mio. Zellen in 3 ml Medium in jede Vertiefung verteilt.

2.2.2.5 Transfektion von HEK293T-Zellen

Für die Transfektionen von HEK293T-Zellen wurde FugeneHD benutzt. FugeneHD ist ein Gemisch aus Lipiden und anderen Komponenten, die DNA komplexieren. Dieser Komplex sorgt für das unbeschadete Eindringen der DNA in Säugerzellen, die somit mit der gewünschten DNA transfiziert werden. Für eine effiziente Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 80-90% aufweisen.

Die Transfektion wurde in 6-well (3,6 cm) Platten durchgeführt. Vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, da das FBS und Antibiotikum im Standardmedium die Transfektion stören. Dafür wurde das alte Medium abgenommen und 2 ml Expressionsmedium (MEM, ohne Zusätze) pro Vertiefung hinzugefügt.

Zur Transfektion wurden 2 µg DNA und 6 µl FugeneHD in 100 µl Transfektionsmedium vermengt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abermals gewechselt und jeweils 3 ml Expressionsmedium hinzugefügt.

Für alle Expressionsstudien, in denen die FIX-Aktivität als Marker für die VKORC1-Funktion dient wurde kohle-aufbereitetes FBS verwendet. Es ist wichtig, dass bei dem Expressionsmedium kein herkömmliches FBS verwendet wird, da in diesem Kälber-FIX vorhanden ist, der auch durch Hitze nicht vollständig inaktiviert werden kann. Die Aktivität des Kälber-FIX wird auch in der Einzelfaktorenanalyse gemessen und würde die Ergebnisse für die Expressionsstudien verfälschen. Daher wird „charcoal stripped“ FBS zur Expression des FIX verwendet. Dieses FBS wurde speziell aufbereitet und enthält keinen messbaren Kälber-FIX.

Zusätzlich wurde bei den FIX-Expressionsstudien Vitamin K₁ (gelöst in DMSO, Endkonzentration 5 ng/µl) und verschiedene Warfarin-Konzentrationen (gelöst in Ethanol, verschiedene Endkonzentrationen 0,01 - 1 µM) dem Expressionsmedium zugesetzt.

2.2.2.6 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die immortalisierte Insekten-Zelllinie Sf9 entstammt aus Ovarzellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda*. Sf9-Zellen können adhären sowie in Suspension kultiviert werden und verdoppeln sich alle 72 Stunden. Insektenzellen werden häufig zur Produktion rekombinanter Proteine mittels Baculoviren verwendet. Der Vorteil neben der hohen Proteinausbeute ist, dass sie fast alle posttranslationalen Modifikationen durchführen. Die exprimierten Proteine sind somit den humanen Proteinen sehr ähnlich.

Die Sf9-Zellen wurden in Grace's Insect Medium (Supplemented, 1x) und FBS für Insektenzellen (10%) (=Standardmedium) bei 29°C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

2.2.2.7 Subkultivierung von Sf9-Zellen

Das Passagieren der Sf9-Zellen erfolgte ohne eine Behandlung mit Trypsin. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen in frischem Medium so lange resuspendiert, bis sich alle Zellen gelöst haben. Die Zellsuspension wurde dann im gewünschten Passagier-Verhältnis auf neue Zellkulturschalen verteilt.

2.2.2.8 Langzeitlagerung von Sf9-Zellen

Für die Langzeitlagerung werden die Zellen in 60% Grace's Insect Medium, 30% FBS und 10% DMSO auf Eis vermengt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei -20°C, anschließend für 24-48 Stunden bei -80°C und zur endgültigen Lagerung im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.2.2.9 Transfektion von Sf9-Zellen

Die Transfektion von Sf9-Zellen erfolgte mit Cellfectin II Reagent, einem speziellen Transfektions-Reagenz für Insektenzellen.

Für die Produktion der Viren wurde Bacmid-DNA (ca. 1000 ng DNA) mit 100 µl Grace's Medium (unsupplemented, ohne Antibiotika und Serum) vermengt. Parallel wurden 8 µl Cellfectin II Reagent in 100 µl Grace's Medium (unsupplemented, ohne Antibiotika und Serum) gegeben. Beide Ansätze wurden zusammengeführt und für 15-30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 210 µl des DNA-Lipid-Mix tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 29°C für 3-5 Stunden in den Brutschrank gestellt. Schließlich erfolgte ein Mediumwechsel mit neuem Grace's Medium (supplemented, mit Serum und Antibiotika). Die transfizierten Zellen wurden 3-7 Tage bei 29°C inkubiert bis sie das letzte virale Stadium, die Lyse der Zellen, erreicht haben.

2.2.2.10 Virus-Herstellung

Mit Viren infizierte Zellen wachsen zuerst bis auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Größe an und bilden Granula in den Zellen. Schließlich lösen sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale und lysieren. Bei der Zellyse wird das Virus frei und befindet sich im Medium, welches für eine erneute Infektion benutzt werden kann.

Mit Bacmid-DNA transfizierte Zellen lysieren spätestens nach 3-5 Tagen, mit Baculoviren infizierte Zellen spätestens nach 3 Tagen. Um das Virus zu sammeln wurde das gesamte Medium abgenommen, für 5 min bei 500 g zentrifugiert um die Zellbestandteile zu entfernen und der Überstand aliquotiert.

Die Lagerung der Viren erfolgte bei 4°C.

2.2.2.11 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay dient der Bestimmung des Titers der hergestellten Baculoviren. Für die Herstellung des Plaque-Mediums sollte zuvor Grace's Insect Cell Culture Medium (2x) bei 40°C sowie 4% Agarose Gel bei 70°C im Wasserbad für 20-30 min vorgewärmt werden. Damit die Agarose nicht fest wird, sollte bei der Herstellung des Plaque-Mediums zügig gearbeitet werden. Zuerst wurden 20 ml FBS in 100 ml Grace's Insect Cell Culture Medium (2x) vermengt. Anschließend wurden 25 ml des mit FBS versetzten Grace's Insect Cell Culture Medium (2x) mit 12,5 ml sterilem Aqua dest. und 12,5 ml 4% Agarose in eine sterile Flasche gegeben. Bis zu seiner Verwendung wurde das Plaque-Medium im Wasserbad bei 40°C flüssig gehalten.

Zu Beginn des Plaque Assays wurden die Sf9-Zellen gezählt und jeweils 5×10^5 Zellen in 2 ml in jede Vertiefung einer 6-well Platte verteilt. Damit die Zellen wieder adhärend wachsen, wurden sie für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Zwischenzeitlich, wurden 8log Virus-Verdünnungen in Grace's Insect Cell Culture Medium (Supplemented ohne FBS) hergestellt. Für den Plaque-Assay wurden allerdings nur die Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-8} verwendet. Wenn die Zellen sich gesetzt haben, wurde das Medium entfernt, mit 1 ml der Virusverdünnung versetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung wieder

abgenommen und jede Vertiefung der 6-well Platte vorsichtig mit 2 ml des Plaque-Mediums bedeckt. Dabei sollte mit der kleinsten Virusverdünnung angefangen und schnell gearbeitet werden, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Platten sollten eine Stunde am Platz stehen bleiben bevor sie bewegt werden.

Schließlich wurden die Zellen bei 29°C im Brutschrank kultiviert. Nach 7-10 Tagen sind die Plaques sichtbar und können gezählt werden.

2.2.2.12 Bestimmung der FIX-Aktivität transfizierter Zellen

HEK-Zellen:

Exakt 72 Stunden nach der Transfektion der Zellen wurden die Mediumüberstände abgenommen, in Vivaspin 6 Aufkonzentrierungsröhrchen (10 kDa) überführt und 22 min bei 4000 rpm bei RT zentrifugiert. Die Röhrchen haben eine Ausschlussgröße von 10 kDa. Mit einer durchschnittlichen Größe von 50 kDa können die Gerinnungsfaktoren somit nicht den Filter passieren. Die Zentrifugation erfolgte bei RT, da bei niedrigeren Temperaturen die Serumproteine ausfallen würden. Nach der Zentrifugation wurde das im Filter verbleibende Konzentrat (ca. 100 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Membran mit 300 µl Owren's Veronal Buffer gespült, um verbleibende Proteine aufzufangen und ebenfalls zum Konzentrat in das Reaktionsgefäß überführt.

Die Proben wurden bei -70°C eingefroren und für die Bestimmung der Gerinnungsaktivität verwendet.

Insekten-Zellen:

Bei der Ernte von Insektenzellen wird das Medium vor der Aufkonzentrierung zur Entfernung der Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls über Vivaspin 6 Aufkonzentrierungsröhrchen aufkonzentriert, allerdings erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei RT. Das Konzentrat wurde direkt für die Bestimmung der Gerinnungsaktivität verwendet und nicht zuvor mit Owren's Veronal Buffer verdünnt.

2.2.3 Dosis-Wirkungs-Kurve und IC₅₀-Berechnung

Mit Hilfe des Levenberg-Marquardt-Algorithmus des KaleidaGraph 4.04 Programms wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und anhand der Kurven die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Warfarin rechnerisch ermittelt. Die FIX-Aktivitäten wurden für jede einzelne Mutation bezüglich ihrer Ausgangsaktivität (0 µM Warfarin) auf 100% normalisiert. Jede Mutation wurde mindestens in Dreifachbestimmung angesetzt, d.h. jede VKORC1-Variante wurde dreimal für jede Warfarin-Konzentration transfiziert. Die Fehlerbalken stellen den s.e.m. (standard error of mean, Standardfehler des Mittelwertes) dar.^[66]

Formel zur Berechnung der IC₅₀ aus den convergenten Parametern (m₁ – m₄)

der Dosis-Wirkungs-Kurven:

$$y = m_1 + \frac{(m_2 - m_1)}{\left[1 + \left(\frac{x}{m_3}\right)^{m_4}\right]} \quad \text{4-Parameter Dosis-Wirkungs-Gleichung}$$

$$y - m_1 = \frac{(m_2 - m_1)}{\left[1 + \left(\frac{x}{m_3}\right)^{m_4}\right]} \quad \text{Auflösen nach x ...}$$

$$x = m_3 \cdot m_4 \sqrt[m_4]{\left(\frac{m_2 - m_1}{y - m_1}\right) - 1} \quad \dots$$

Substitution von IC₅₀ für x und y=50, da per Definition die Einheit der Ordinate „% Aktivität“ darstellt.

$$IC_{50} = m_3 \cdot m_4 \sqrt[m_4]{\left(\frac{m_2 - m_1}{50 - m_1}\right) - 1}$$

Die m_{4te}-Wurzel wird errechnet durch:

$$\sqrt[n]{x} = e^{\frac{\ln x}{n}}$$

Die m_{4te}-Wurzel des Radikanden R wird errechnet als $\sqrt[m_4]{R} = e^{\frac{\ln R}{m_4}}$

2.2.4 Proteinmodellierung

Das Proteinmodellierung wurde anhand der bekannten Kristallstruktur des bakteriellen VKOR-Homologons aus *Synechococcus sp.* mit dem Programm YASARA (Version 12.9.27) durchgeführt.^[16] Es wurden 12 Abgleiche mit Hilfe der Jalview 2.7 Plattform mit MAFFT, T-coffee und MUSCLE durchgeführt und das beste Proteinmodell mit den günstigsten sterischen Parametern ausgewählt. Anschließend wurde das Modell in einer solvatisierten Umgebung simuliert und das Modell mit der niedrigsten Energie ausgewählt (500 ps simulation, AMBER03 force field). Die stereochemische Qualität wurde unter Benutzung des MOLPROBITY Server und mit PROCHECK überprüft. Anschließend wurde das Modell in einer Phosphatidylcholin-Membran unter Verwendung von YASARA simuliert.

Die Warfarinbindung wurde mit dem fertigen Modell für die hVKORC1 mit AUTODOCK in YASARA simuliert.^[67,68] Schließlich wurde das Modell mit der höchsten positiven Bindungsenergie und den niedrigsten inhibitorischen Konstanten ausgewählt.

3 Ergebnisse

Um mehr Aufschluss über den Mechanismus der Inhibition der VKORC1 durch Warfarin - und somit stellvertretend für alle Cumarine - zu erhalten, wurde eine neue Methode entwickelt, die physiologisch sinnvollere Ergebnisse erzielt, als der bekannte „klassische“ VKOR-DTT Assay (Abschnitt 3.1).

Neben der Etablierung der Methode wurden in dieser Arbeit alle bekannten Mutationen, die zu einer Cumarinresistenz führen, mit dem neuen Assay untersucht. Dadurch konnten die jeweiligen Mutationen bezüglich ihrer Warfarininhibition näher charakterisiert werden (Abschnitt 3.3).

Zusätzlich wurde ein Proteinmodell der hVKORC1 anhand der bekannten Kristallstruktur des bakteriellen VKOR-Homologs (*Synechococcus sp.*) entwickelt und die Warfarinbindung an diesem Modell simuliert, um die *in vitro* Ergebnisse mit *in silico* Daten zu unterlegen (Abschnitt 3.2).

Schließlich sollte mit dem neuen Assay geklärt werden, ob NQO1 oder VKORC1L1 eine Bypassfunktion im Vitamin K-Zyklus besitzen. Dazu wurde das neue System zusätzlich auf mit Baculoviren infizierte Insektenzellen übertragen (Abschnitt 3.4).

3.1 Etablierung einer neuen Methode zur Messung der VKORC1-Aktivität

Die Idee der zu entwickelnden Methode ist, die VKOR-Aktivität rekombinant exprimierter VKORC1-Varianten in Zellen indirekt über die spezifische Aktivität des koexprimierten FIXs zu messen. Die FIX-Aktivität dient somit in diesem Assay als Surrogat-Marker für die Funktion der VKORC1-Varianten.

Zuerst wurde die cDNA des humanen *F9* (hF9) in die multiple cloning site A (MSC A) und die der hVKORC1 in die multiple cloning site B (MSC B) des pIRES-Vektors kloniert (NM_000133, NM_024006; Vektorkarte siehe Anhang A.2). Zur Untersuchung cumarinresistenter Mutationen wurden die jeweiligen Aminosäureaustausche anschließend in einer weiteren Mutagenisierungsreaktion in die hVKORC1 cDNA eingebracht.

3. Ergebnisse

Der bicistronische Vektor wurde mittels des Transfektionsreagenzes FugeneHD in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 4-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Enthält das Expressionsmedium 10% Standard-FBS, so wird der im herkömmlichen FBS enthaltene Rinder-FIX ebenfalls im Gerinnungstest gemessen (110% FIX-Aktivität, siehe Tab. 3.1). Auch bei einer Hitzeinaktivierung des Standard-FBS werden 45% FIX-Aktivität gemessen, so dass die Ergebnisse bei Benutzung des herkömmlichen FBS stark verfälscht würden. Um die Benutzung des herkömmlichen FBS zu umgehen, wurde eine mehrwöchige Adaptierung der HEK293T-Zellen an serumfreie Konditionen mit Panexin NTA (PAN Biotech GmbH) durchgeführt, die allerdings erfolglos blieb. Schließlich konnte ein über Aktivkohle aufgereinigtes FBS der Firma Invitrogen (charcoal stripped FBS) ausfindig gemacht werden, welches keinen Rinder-FIX enthält. Im Gegensatz dazu enthält das über Aktivkohle aufgereinigte FBS der Firma PAN 10% FIX-Aktivität nach der Aufkonzentrierung der Proben (Tab. 3.1). Eine dauerhafte Kultivierung der HEK293T-Zellen mit diesem speziellen Serum ist zwar nicht möglich, jedoch beeinträchtigt die 72-stündige Inkubation der Zellen nach der Transfektion mit dem über Aktivkohle aufgereinigten Serum die Viabilität der Zellen nicht und resultiert in messbarer FIX-Aktivität.

Tab. 3.1: FIX-Aktivitäten verschiedener fetaler Rinderseren.

Mit hF9 cDNA transfizierte bzw. untransfizierte HEK293T-Zellen wurden nach der Transfektion mit Medien, die verschiedene Seren enthielten, kultiviert. Die FIX-Aktivität wurde nach der Aufkonzentrierung des Mediums gemessen.

HEK293T-Zellen	Verwendetes FBS [10%]	FIX-Aktivität [%]
transfiziert	Sera Plus	110%
transfiziert	Sera Plus dekomplementiert (30 min, 57°C)	75%
untransfiziert	Sera Plus dekomplementiert (30 min, 57°C)	45%
untransfiziert	Kohlegefiltertes FBS (PAN Biotech)	10%
untransfiziert	Kohlegefiltertes FBS (Invitrogen)	0%

Weiter ist eine Zugabe von Vitamin K₁ im Expressionsmedium (5 ng/μl, in DMSO) notwendig um aktivierten FIX messen zu können. Ohne Vitamin K-Zusatz im Medium ist kein FIX im Überstand messbar. Um die Warfarinhibitierbarkeit zu untersuchen enthielt das Expressionsmedium verschiedene Konzentrationen an Warfarin (0,0 -

3. Ergebnisse

1,0 μM , in EtOH). Bei 1,0 μM Warfarin im Medium ist die koexprimierte wt hVKORC1 komplett inhibiert, da kein aktivierter FIX im Überstand messbar ist. Die finalen Konzentrationen von 0,0061% DMSO und 0,02% EtOH wurden in jedem Experiment konstant gehalten und lagen unterhalb der Toxizitätsgrenze der Zellen. 72 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gesammelt und in Vivaspin 6 Säulen (10.000 MWCO) durch Zentrifugation aufkonzentriert (4000 rpm, 22 min, 25°C; Abb. 3.1). Das Konzentrat wurde in 300 μl Owen's Veronal Puffer aufgenommen und die FIX- Aktivität gemessen.

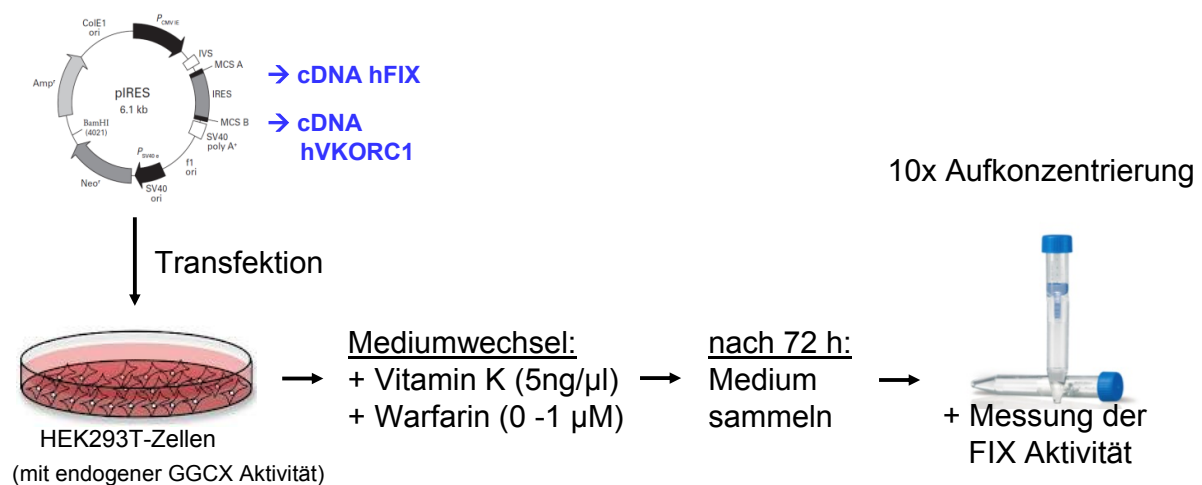


Abb. 3.1: Schema des experimentellen Verlaufs der neuen Methode zur Messung der VKORC1-Aktivität.

HEK293T-Zellen werden mit einem bicistronischen Vektor, der die cDNA des hF9 und der hVKORC1 enthält, transfiziert. Das Expressionsmedium enthält Vitamin K₁ und verschiedene Konzentrationen an Warfarin. Nach 72h wird das Medium aufkonzentriert und die FIX-Aktivität gemessen.

Als Protein-Expressionskontrolle für die VKORC1 dienten Western Blots, für den FIX wurde eine Antigenbestimmung mit dem Zellkulturkonzentrat durchgeführt.

3.2 Proteinmodellierung

3.2.1 Proteinstruktur der humanen VKORC1

Abgeleitet von der bekannten Kristallstruktur des bakteriellen VKOR-Homologs (*Synechococcus sp.*) wurde ein Proteinmodell für die humane VKORC1 erstellt.

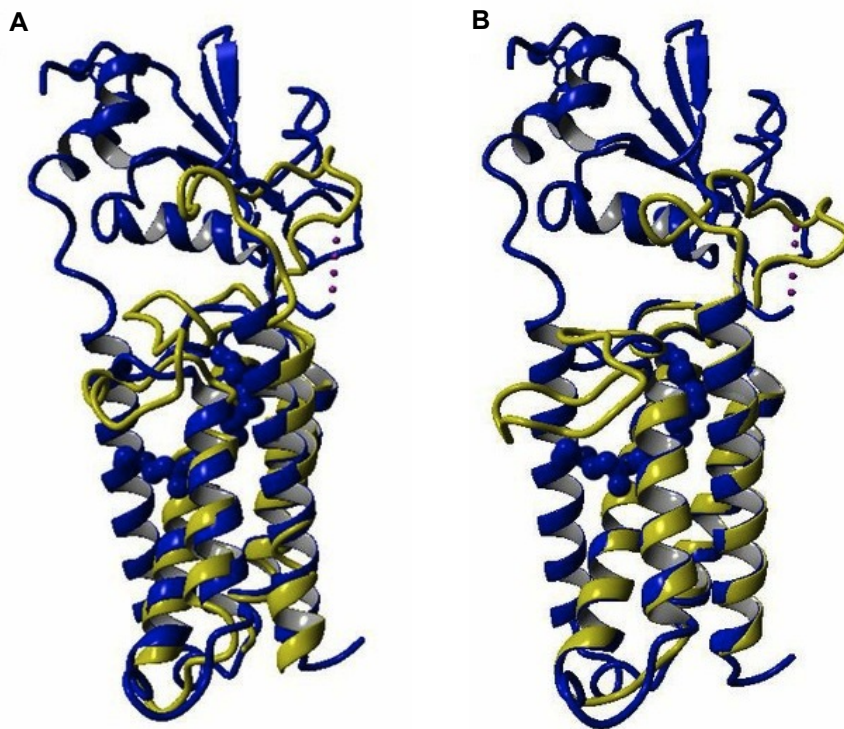


Abb. 3.2: Struktur-Vergleich zwischen der humanen VKORC1 und der *Synechococcus sp.*-VKOR.

Quartärstruktur der *Synechococcus*-VKOR (in blau) und der humanen VKORC1 (in gelb). Der transmembranäre Teil der hVKORC1 ist dem bakteriellen VKOR-Homolog strukturell ähnlicher ($0,633 \text{ \AA}^\circ$) als der ER-lumenale Loop ($0,939 \text{ \AA}^\circ$).

A: *Synechococcus*-VKOR und hVKORC1-Modell in wässriger Lösung.

B: *Synechococcus*-VKOR und hVKORC1-Modell in einer Phosphatidylcholin-Membran (Membran nicht gezeigt).

Die *Synechococcus*-VKOR ist im Gegensatz zur humanen VKORC1 aus fünf Transmembrandomänen (TM-Domäne) aufgebaut. Die fünfte Transmembranhelix ist über einen Linker mit einer *trx* like-Domäne verbunden, die der bakteriellen VKOR Elektronen bereitstellt. In Vertebraten ist die fünfte TM-Domäne nicht vorhanden und die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten wird separat von den PDIs

übernommen. Daher sind die *Synechococcus*-VKOR und die hVKORC1 nur in den ersten vier TM-Domänen homolog zueinander, so dass die hVKORC1 in unserem Model ebenfalls nur aus vier TM-Domänen aufgebaut ist (siehe Abb. 3.2). Auch besitzt die hVKORC1 in unserem Modell wie das bakterielle Homolog einen großen ER-luminalen Loop zwischen der ersten (TM1) und zweiten (TM2) TM-Domäne, sowie eine kleine serinreiche Helix, die sich im ER-luminalen Loop befindet (3₁₀-Helix, siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3B). Die TM-Domänen der hVKORC1 weisen eine höhere Homologie zur *Synechococcus*-VKOR auf (0,633 A°) als die periplasmatischen Anteile des Proteins (0,939 A°).

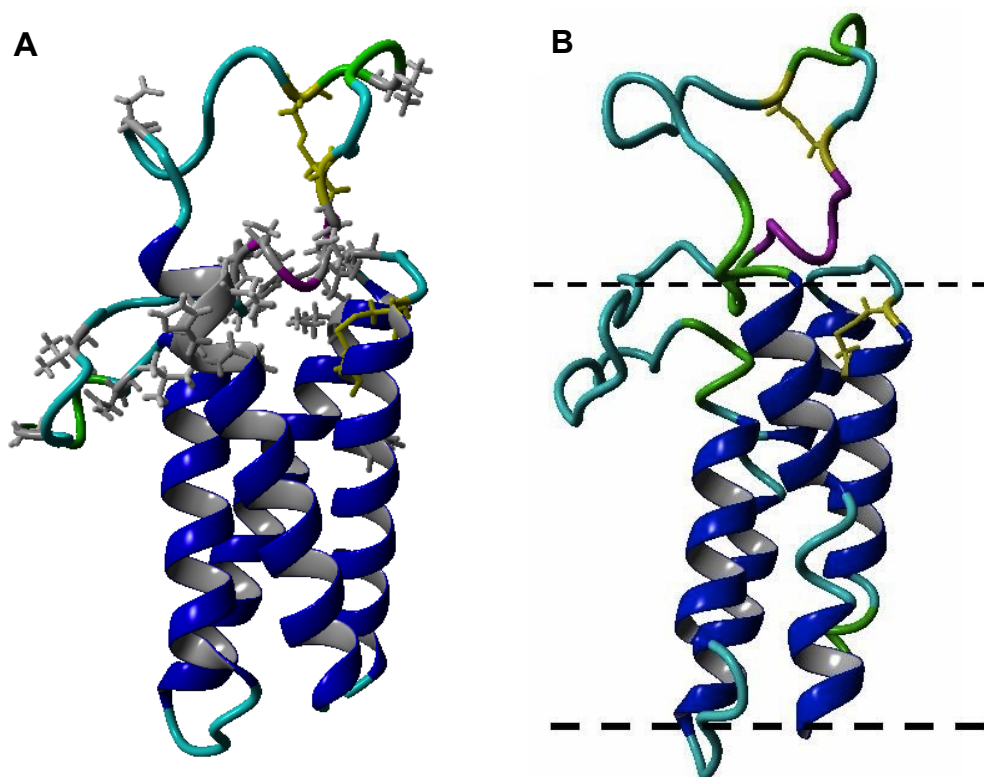


Abb. 3.3: Struktur der humanen VKORC1 basierend auf der *Synechococcus sp.*-Kristallstruktur.

Anhand der bekannten Kristallstruktur des bakteriellen VKOR Homologs (*Synechococcus sp.*) ermittelte dreidimensionale Proteinstruktur der humanen VKORC1.^[16] Die vier Transmembran-Domänen sind in blau und die 3₁₀-Helix in magenta dargestellt. Die konservierten Cysteine des ER-luminalen Loops und des CXXC-Motivs und deren Seitenketten sind in gelb hervorgehoben.

A: Das hVKORC1-Modell wurde in einer wässrigen Umgebung erstellt. Die Seitenketten der Aminosäuren an denen Mutationen bekannt sind, die zu einer Cumarinresistenz führen, sind grau markiert.

B: Proteinstruktur der humanen VKORC1 in einer Phosphatidylcholin-Membran. Die gestrichelte Linie stellt die Grenzfläche der Membran dar.

Alle bekannten humanen Mutationen, die zu einer Cumarinresistenz führen, sind entweder in dem großen ER-luminalen Loop (17 Mutationen) oder in den ER-Lumen zugewandten Anteilen der Transmembranhelices lokalisiert (7 Mutationen; siehe Abb. 3.3A).

Tab. 3.2: VKOR-Strukturen nach Li *et al.* und nach unserem Proteinmodell.

Tabellarisch sind die wichtigsten Strukturen der VKORC1 wie die Transmembrandomänen, der ER-lumenale Loop und die darin lokalisierte serinreiche Helix, festgehalten. Die Aminosäuren, die diese Strukturen in der *Synechococcus sp.*-VKOR sowie der hVKORC1 betreffen sind daneben aufgelistet.

VKOR-Struktur	<i>Synechococcus</i>- VKOR	hVKORC1 (nach <i>Synechococcus sp.</i>)	hVKORC1 (nach unserem Modell)
TM-Domäne 1	Arg20 - Glu44	Arg12 - Asp36	Gly9 - Arg33
TM-Domäne 2	Pro71 - Leu89	Ser79 - Leu97	Ser79 - Cys96
TM-Domäne 3	Arg98 - Val125	Arg100 - Val127	Ser101 - Phe126
TM-Domäne 4	Cys130 - Leu149	Cys132 - Arg151	Val134 - Phe150
ER-luminaler Loop	Gln45 - Ile70	Arg37 - Gln78	Ala34 - Gln78
½-Helix bzw. 3 ₁₀ -Helix	Asp57 - Ser62	Ser52 - Ser57	Arg53 - Ser57

3.2.2 Warfarin-Bindungsstellen in der VKORC1

Um weiteren Aufschluss über die Warfarinbindung zu erhalten, wurde mit Hilfe des Proteinmodells die Bindung des Warfarins an die hVKORC1 simuliert (Abb. 3.4 und Abb. 3.5).

Die Simulation der Warfarinbindung ergab 12 Möglichkeiten für die Bindung des Warfarins an die hVKORC1. Da die Anzahl der möglichen Bindungsstellen gering ist, spricht dies sehr für die Qualität des Modells (Abb. 3.4). Die Bindungsstelle mit den besten Parametern, wie z.B. der besten Bindungsenergie (7,02 kcal/mol), wurde für die folgende Analyse der beteiligten Kontaktflächen in der hVKORC1 gewählt (siehe rote Warfarin-Struktur in Abb. 3.4). Somit konnten drei Kontaktflächen in der hVKORC1 identifiziert werden, die mit Warfarin interagieren (Abb. 3.5). Die Kontaktflächen betreffen Aminosäuren in der ersten TM-Domäne der hVKORC1 (=Kontaktfläche I), der 3₁₀-Helix im ER-luminalen Loop (=Kontaktfläche II) und der vierten TM-Domäne (=Kontaktfläche III; Abb. 3.5, Abb 3.6 und Tab. 3.3).

Die meisten hVKORC1-Mutationen (19 Mutationen), die zu einer Cumarinresistenz führen, konnten einer dieser Kontaktflächen zugeordnet werden (Tab. 3.3). Weitere fünf Mutationen, die drei Aminosäuren im C-terminalen Loop der hVKORC1 betreffen (Val66, Gly71 und Asn77), konnten keiner der drei ermittelten Kontaktstellen zugeordnet werden (Abb. 3.6B). Diese befinden sich in einem Abschnitt des ER-luminalen Loops, der in die Phosphatidylcholin-Membran eingebettet ist (Abb. 3.3A).

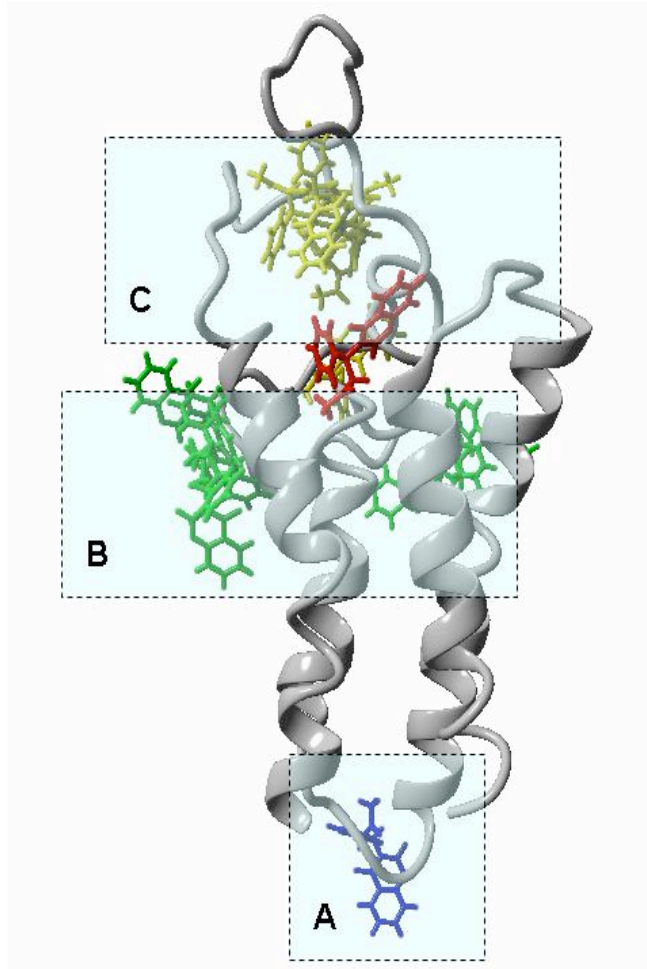


Abb. 3.4: Mögliche Warfarin-Bindungsstellen in der humanen VKORC1.

Dreidimensionale Darstellung der hVKORC1 (in der Membran) und der möglichen Bindungsstellen von Warfarin-Molekülen. Das blaue Warfarin-Molekül würde an den cytoplasmatischen Teil der hVKORC1 binden (Fläche A), die grünen Warfarin-Moleküle würden in der Membran an die hVKORC1 binden (Fläche B) und die gelben Warfarin-Moleküle würden an die periplasmatischen Anteile der hVKORC1 binden (Fläche C). Die rote Warfarin-Struktur stellt die Bindungsstelle mit den besten Bindungsparametern dar und wurde für die Modellierung der Warfarin-Kontaktflächen verwendet.

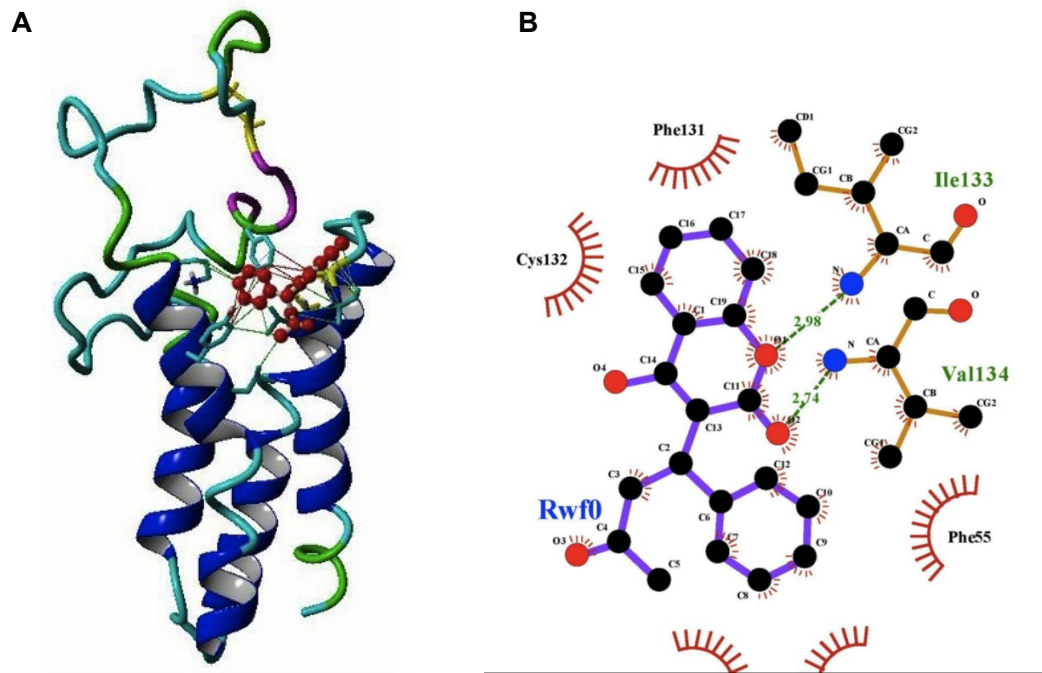


Abb. 3.5: Warfarin-Bindung im Modell der humanen VKORC1.

A: Warfarin-Bindung an der hVKORC1. Dreidimensionale Darstellung der hVKORC1 und der Bindung eines Warfarin-Moleküls (in rot). Die Linien zwischen dem Warfarin-Molekül und der hVKORC1 zeigen hydrophobe Interaktionen und π -Bindungen.

B: 2D-Darstellung der Warfarin-hVKORC1 Interaktion (ligplot). Ile133 und Val134 bilden mit Warfarin eine Wasserstoffbrückenbindung aus (grün gestrichelte Linie). Ala26 und Val29 der Kontaktfläche I, Phe55 (Kontaktfläche II), Phe131 und Cys132 (Kontaktfläche III) gehen eine hydrophobe Interaktion mit Warfarin ein.

Tab. 3.3: Warfarin-Kontaktflächen in der humanen VKORC1.

Drei Kontaktflächen in der hVKORC1 sind an der Warfarinbindung beteiligt (hier Kontaktfläche I, II und III benannt). Die erste Kontaktfläche betrifft die erste Transmembrandomäne, die zweite Kontaktfläche Aminosäuren im ER-luminalen Loop und der 3_{10} -Helix und die dritte Kontaktfläche befindet sich zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne sowie in der vierten Transmembrandomäne.

Kontaktfläche	Betreffende Aminosäuren in der hVKORC1	hVKORC1 Mutation, die die Kontaktfläche beeinflussen
I	Leu22 - Val29	Ala26Thr, Ala26Pro, Leu27Val, His28Gln, Val29Leu
II	Ser52 - Phe55	Ser52Leu, Ser52Trp, Val54Leu, Asp36Gly, Asp36Tyr, Val45Ala, Ser56Phe, Arg58Gly, Trp59Arg, Trp59Cys, Trp59Leu
III	Phe131 - Thr137	Leu128Arg, Ile123Asn, Tyr139His
-	-	Val66Gly, Val66Met, Gly71Ala, Asn77Ser, Asn77Tyr

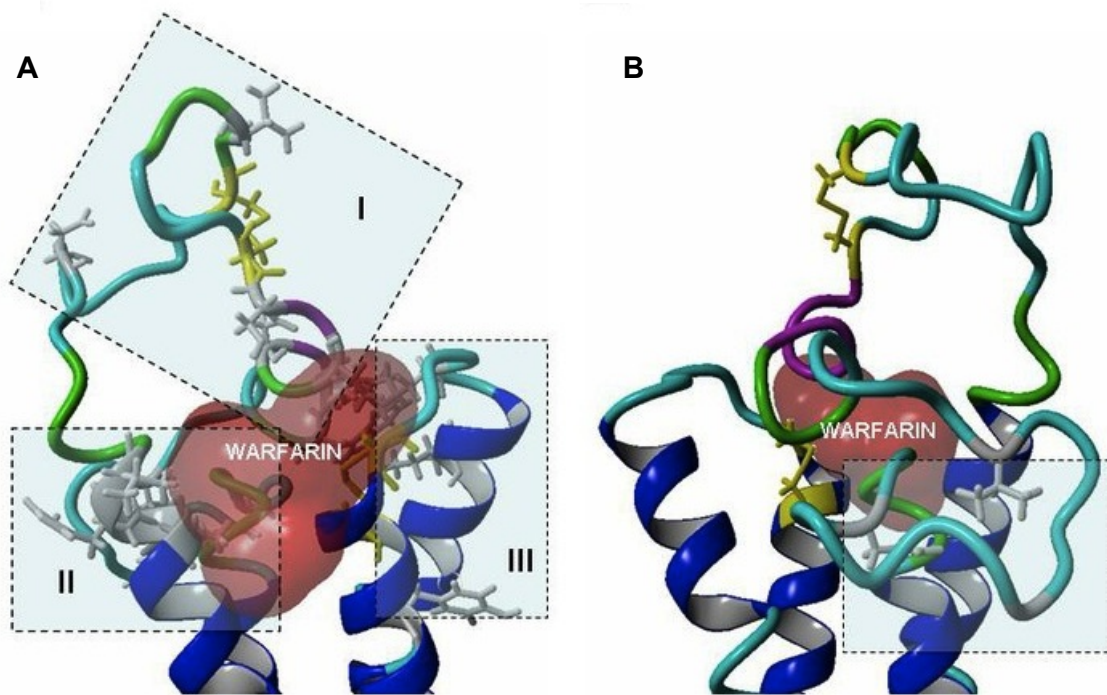


Abb. 3.6: Warfarin-Kontaktflächen in der humanen VKORC1.

Ausschnitt aus der hVKORC1 der mit Warfarin (in rot) interagiert. Die Seitenketten der konservierten Loop-Cysteine sowie der Cysteine im aktiven Zentrum (CXXC-Motiv) sind gelb markiert. Die Seitenketten der Aminosäuren an denen Mutationen bekannt sind, die zu einer Cumarinresistenz führen, sind in grau eingezeichnet.

A: Die drei Warfarin-Kontaktflächen I-III sind hellblau hinterlegt und mit I, II, III beschriftet.

B: Die hellblau hinterlegte Fläche zeigt den in die Membran eingelassenen Anteil des großen ER-luminalen Loops (zwischen TM1 und TM2) mit den hVKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden konnten (in grau).

3.3 Untersuchung cumarinresistenter VKORC1 Mutationen

Zur Untersuchung der cumarinresistenten Mutationen wurden alle 24 bekannten humanen Mutationen in der *VKORC1* in den bicistronischen Vektor eingebracht und anschließend mittels der neuen zellbasierten Methode untersucht.^[52] Generell zeigten alle Mutationen eine Cumarinresistenz, die von einem milden bis zu einem kompletten Resistenzgrad reichten. Die untersuchten Mutationen wurden in Gruppen eingeteilt, die aus dem hVKORC1-Proteinmodell abgeleiteten Warfarin-Kontaktflächen hergeleitet wurden (Kontaktfläche I-III; Abschnitt 3.2.2, Tab. 3.3). Die Daten wurden graphisch als Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt (Abb. 3.14–3.21), wobei die schwarze Kurve immer die koexprimierte wt hVKORC1 darstellt und als Referenz zu den koexprimierten VKORC1-Varianten gilt. Zusätzlich wurde anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven für jede Mutation die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Warfarin errechnet (Tab. 3.4). IC_{50} ist die Konzentration an Warfarin, die für eine 50%ige Inhibierung der VKORC1 benötigt wird und ist eine gängige pharmakologische Größe, um Enzyme und deren Inhibitoren zu charakterisieren.

3.3.1 Expression der VKORC1-Varianten und des FIX

Als Expressionskontrolle für die VKORC1 dienen Western Blots, um zu überprüfen, ob die Mutation die Expression der jeweiligen VKORC1-Variante nicht beeinflusst. Da keine spezifischen Antikörper gegen die VKORC1 erhältlich sind, wurde die cDNA der *VKORC1* und ihre Varianten in den pcDNA3.1myc Vektor kloniert, durch den am Ende des Proteins ein C-Myc-Tag angefügt wurde. Die Immundetektion erfolgte mittels eines Antikörpers, der gegen den C-Myc-Tag gerichtet ist. Nach Detektion der VKORC1 wurde die Membran von den Antikörpern befreit und mit einem Antikörper, der gegen ERGIC-53 (Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiment) gerichtet war, inkubiert und detektiert. ERGIC-53 diente als Proteinreferenz in der jeweiligen Probe.

3. Ergebnisse

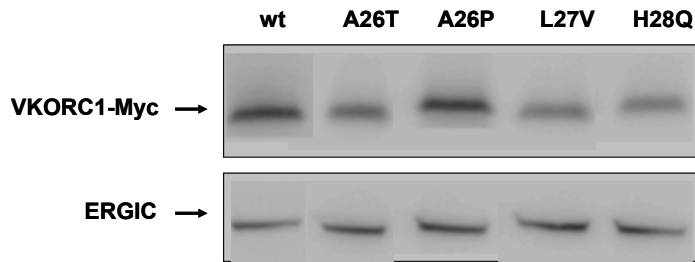


Abb. 3.7: Expression der VKORC1-Mutationen, die der ersten Kontaktfläche angehören.

In der ersten Spur wurde Zelllysate von HEK293T-Zellen, die mit der wt hVKORC1 cDNA transfiziert wurden, aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen die Zelllysate der entsprechend markierten VKORC1-Varianten. Die Expression von ERGIC-53 ist unterhalb der VKORC1-Expression der jeweiligen Mutationen zu sehen.

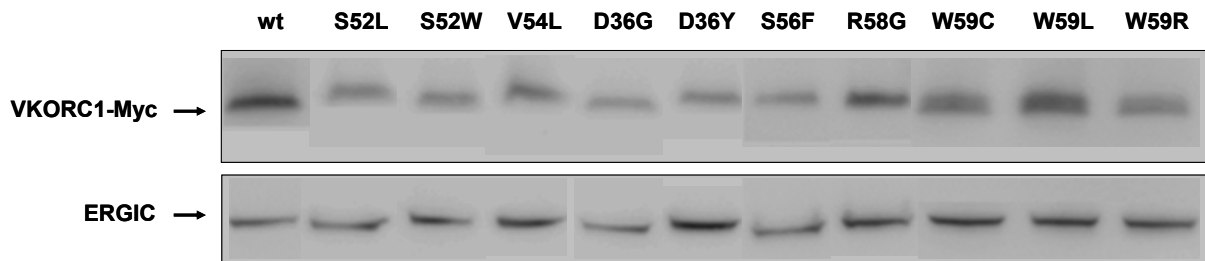


Abb. 3.8: Expression der VKORC1-Mutationen, die der zweiten Kontaktfläche angehören.

In der ersten Spur wurde Zelllysate von HEK293T-Zellen, die mit der wt hVKORC1 cDNA transfiziert wurden, aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen die Zelllysate der entsprechend markierten VKORC1-Varianten. Die Expression von ERGIC-53 ist unterhalb der VKORC1-Expression der jeweiligen Mutationen zu sehen.

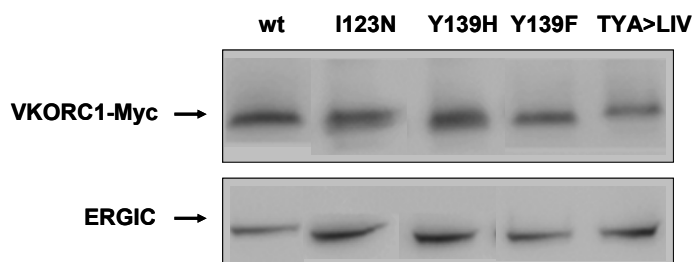


Abb. 3.9: Expression der VKORC1-Mutationen, die der dritten Kontaktfläche angehören.

In der ersten Spur wurde Zelllysate von HEK293T-Zellen, die mit der wt hVKORC1 cDNA transfiziert wurden, aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen die Zelllysate der entsprechend markierten VKORC1-Varianten. Die Expression von ERGIC-53 ist unterhalb der VKORC1-Expression der jeweiligen Mutationen zu sehen.

3. Ergebnisse

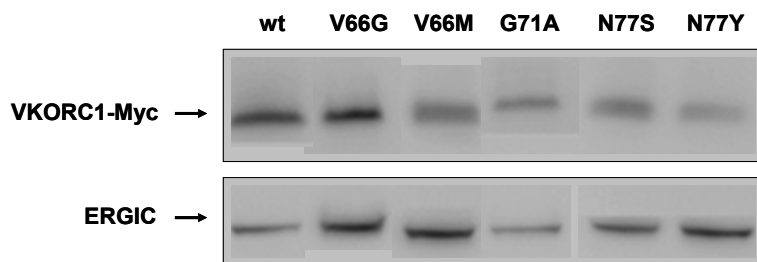


Abb. 3.10: Expression der VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden konnten.

In der ersten Spur wurde Zelllysate von HEK293T-Zellen, die mit der wt hVKORC1 cDNA transfiziert wurden, aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen die Zelllysate der entsprechend markierten VKORC1-Varianten. Die Expression von ERGIC-53 ist unterhalb der VKORC1-Expression der jeweiligen Mutationen zu sehen.

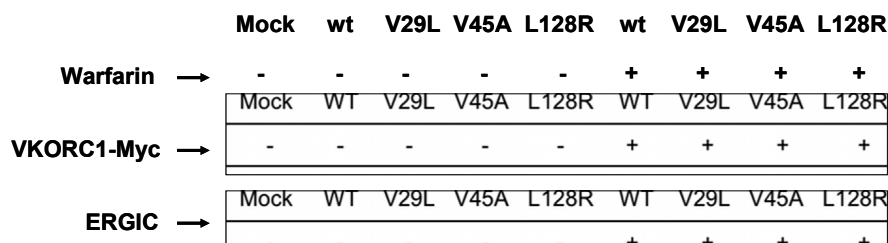


Abb. 3.11: Expression von VKORC1-Mutationen, die mit Warfarin behandelt wurden.

In der ersten Spur wurde Zelllysate von HEK293T-Zellen, die Mock transfiziert wurde, aufgetragen. Die weiteren Spuren zeigen die Zelllysate der entsprechend markierten VKORC1-Varianten. Das „-“ oder „+“ zeigt an, ob die Zellen ohne bzw. mit 1 μ M Warfarin behandelt wurden. Die Expression von ERGIC-53 ist unterhalb der VKORC1-Expression der jeweiligen Mutationen zu sehen.

Die VKORC1 besitzt ein Molekulargewicht von 18,24 kDa, der C-Myc-Tag ungefähr 1,2 kDa, so dass die VKORC1-Varianten bei circa 20 kDa detektiert wurden. ERGIC-53 wurde bei 53 kDa detektiert.

Anhand der Western Blots ist zu sehen, dass die Expression der VKORC1-Varianten durch die jeweiligen Mutationen nicht wesentlich beeinflusst werden. Zudem ist die VKORC1-Expression ebenfalls bei der Zugabe von Warfarin (1 μ M) vergleichbar zu der VKORC1-Expression in den Zellen, die allein mit Vitamin K (5 ng/ μ l) inkubiert wurden.

FIX-Antigen Bestimmung

Die Menge an FIX-Protein im Medium wurde mittels eines Enzym-Immunoassays nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.2.1.13). Der verwendete Anti-hFIX-Antikörper detektiert γ -carboxylierten sowie uncarboxylierten FIX.

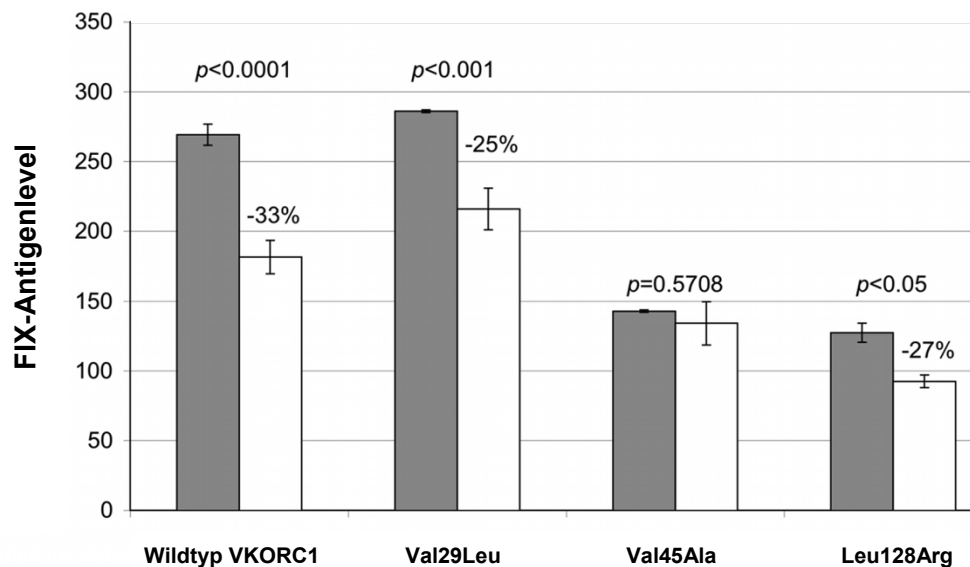


Abb. 3.12: FIX-Antigenlevel von drei exemplarischen VKORC1-Varianten.

Die Bestimmung des FIX-Antigens wurde jeweils für drei aufkonzentrierte Proben pro VKORC1-Variante durchgeführt. Die dunklen Balken stellen die FIX-Antigenlevel der Proben dar, die nur mit Vitamin K₁ (5 ng/μl) kultiviert wurden; die weißen Balken zeigen die FIX-Antigenspiegel der Proben, die mit Vitamin K₁ und 1 μM Warfarin kultiviert wurden.

Die FIX-Antigenbestimmung wurde neben mit wildtyp VKORC1 koexprimierten FIX exemplarisch für drei weitere VKORC1-Varianten für je drei Ansätze bei 0 μM und 1 μM Warfarin durchgeführt. Alle untersuchten Proben weisen FIX-Antigenspiegel von über 100% auf. Zellen, die zusätzlich mit 1 μM Warfarin behandelt wurden, besitzen bei der Koexpression aller vier VKORC1-Varianten geringere FIX-Antigenlevel im Vergleich zu den Proben, die nicht mit Warfarin behandelt wurden (Abb. 3.12).

3.3.2 Dosis-Wirkungs-Kurven cumarinresistenter VKORC1-Mutationen

Die Dosis-Wirkungs-Kurven stellen die FIX-Aktivitäten der koexprimierten VKORC1-Varianten in Abhängigkeit der verwendeten Warfarin-Konzentration dar (Abb. 3.14–3.21).

3.3.2.1 Endogene VKOR-Aktivität in HEK293T-Zellen

Um die endogene VKORC1-Aktivität der Zellen zu ermitteln, wurden HEK293T-Zellen allein mit hF9 cDNA, d.h. ohne zusätzlicher VKORC1 cDNA, transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an Warfarin inkubiert (0,0 -1,0 μM).

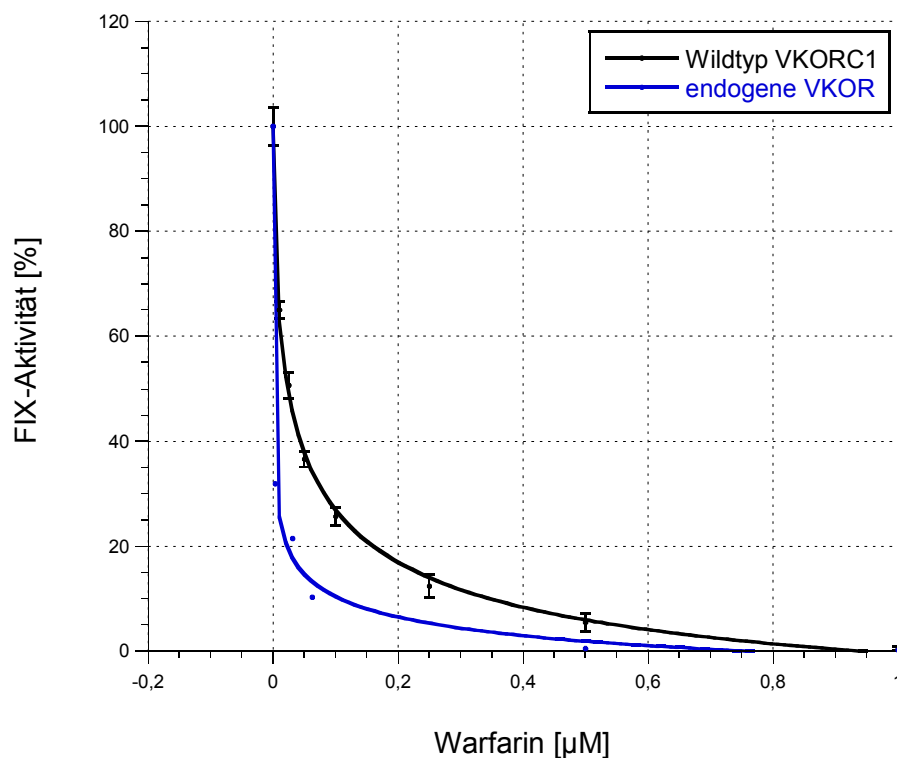


Abb. 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve der endogenen VKOR-Aktivität von HEK293T-Zellen.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 μM). Zellen, die allein mit hF9 cDNA transfiziert wurden, stellen die endogene VKOR-Aktivität dar und sind als blaue Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve in schwarz stellt die FIX-Aktivität der kotransfizierten wt hVKORC1 dar.

Die endogene VKORC1 der HEK293T-Zellen benötigt wesentlich geringere Mengen an Warfarin für eine halbmaximale Inhibition (0,37 nM) als die kotransfizierte wt hVKORC1 (24,7 nM; Tab. 3.4).

3.3.2.2 VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche I

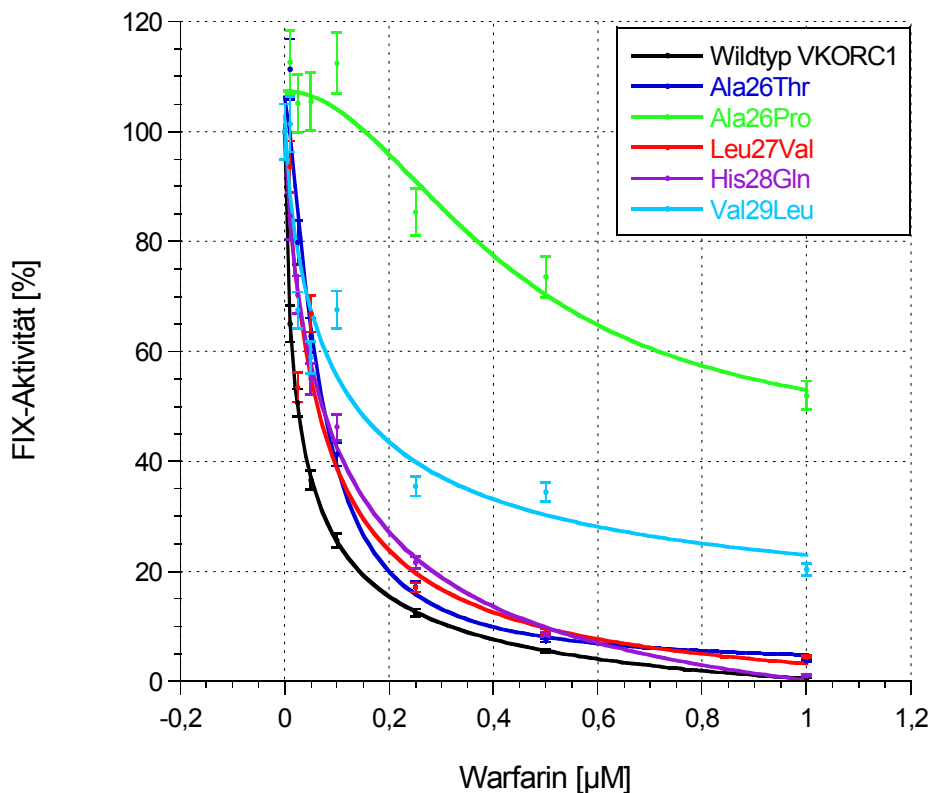
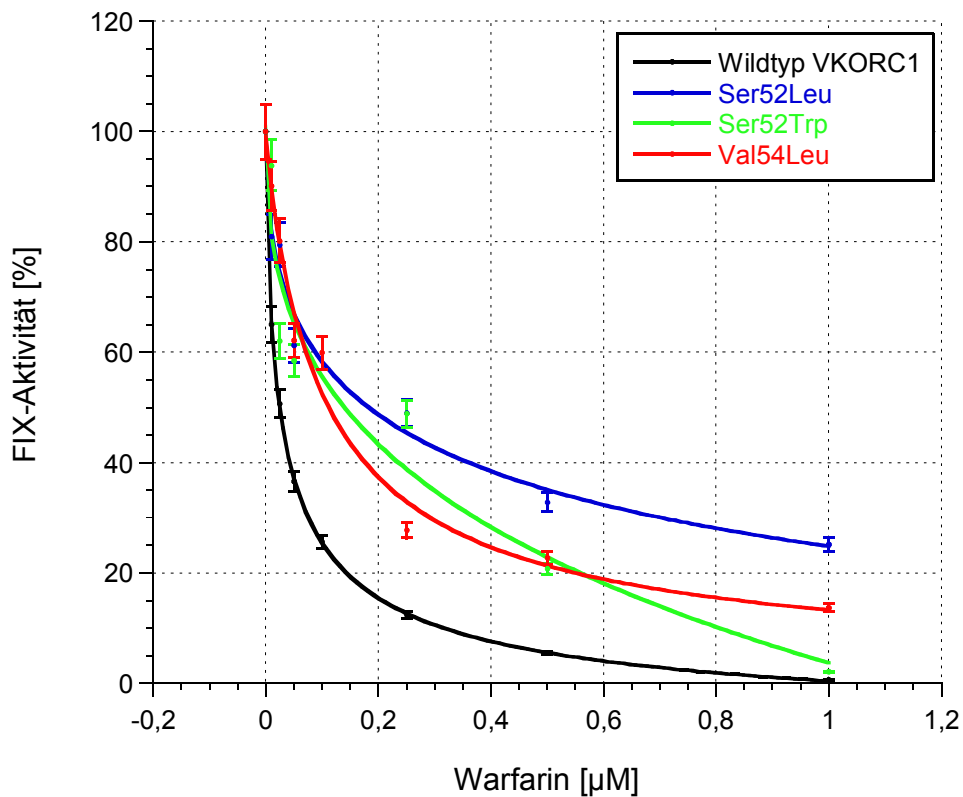


Abb. 3.14: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der Kontaktfläche I.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 µM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Ala26Pro (marineblau), Ala26Thr (grün), Leu27Val (rot), His28Gln (violett) und Val29Leu (hellblau).

In der Kontaktfläche I besitzt die hVKORC1-Variante Ala26Pro mit einer IC₅₀ von 1224 nM die höchste Warfarin-Resistenz, die niedrigste Resistenz besitzt die Mutation Leu27Val (62,3 nM). Die errechneten IC₅₀-Werte aller VKORC1-Varianten sind in Tabelle 3.4 festgehalten.

3.3.2.3 VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche II**Abb. 3.15: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der 3₁₀-Helix.**

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 μM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Ser52Leu (marineblau), Ser52Trp (grün), Val54Leu (rot).

3. Ergebnisse

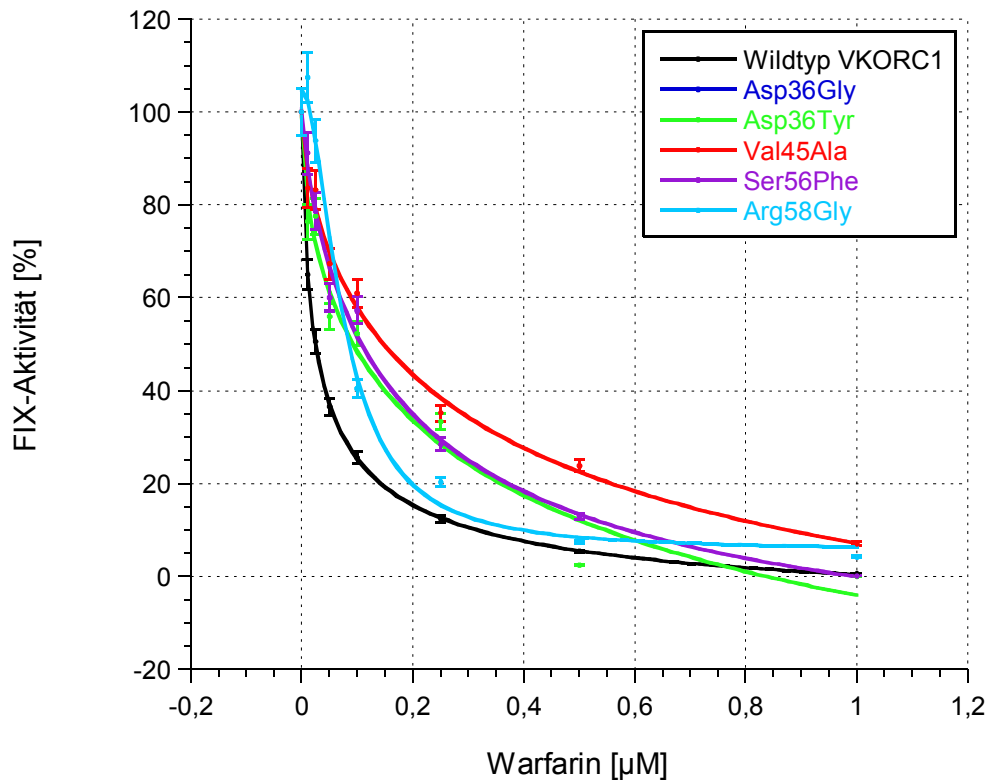


Abb. 3.16: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen, die indirekt Einfluss auf die Kontaktfläche II nehmen.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 μM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Asp36Gly (marineblau), Asp36Tyr (grün), Val45Ala (rot), Ser56Phe (violett) und Arg58Gly (hellblau).

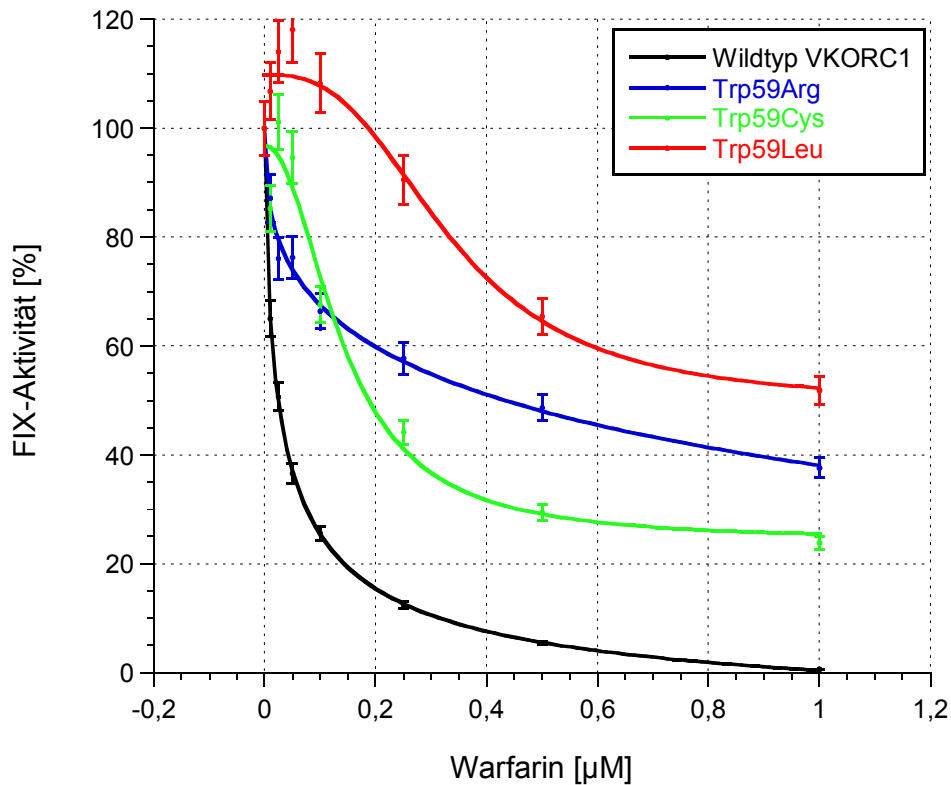
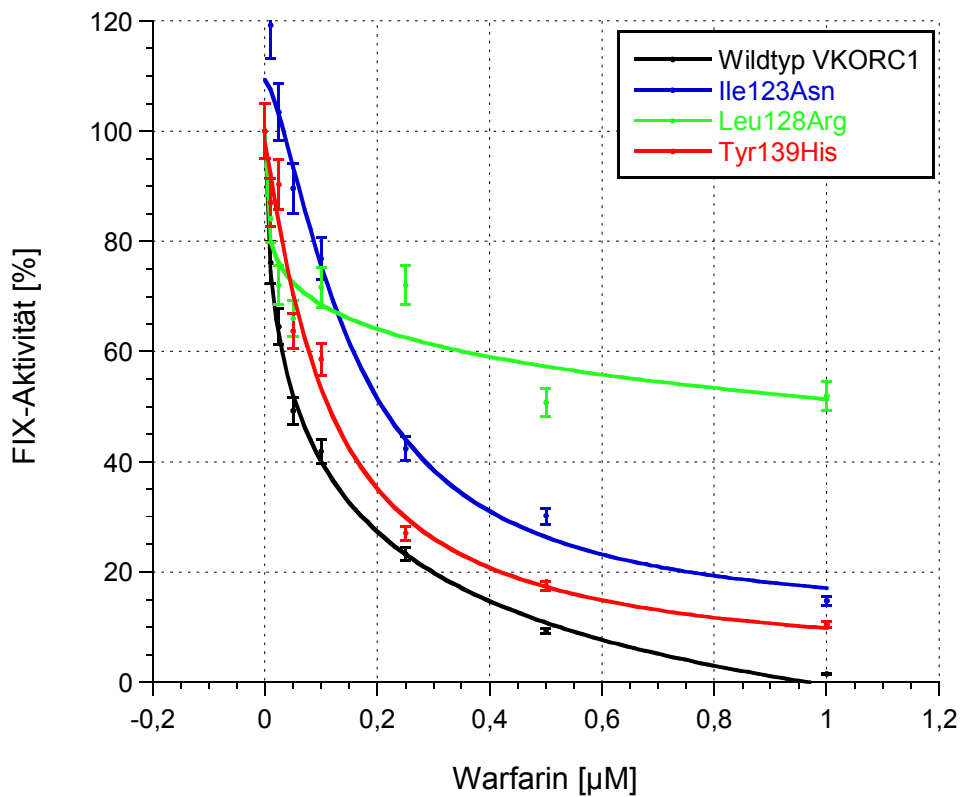


Abb. 3.17: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen, die die Aminosäure Trp59 betreffen.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 µM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Trp59Arg (marineblau), Trp59Cys (grün), Trp59Leu (rot).

In der Kontaktfläche II besitzt die Mutation Trp59Leu die höchste Warfarin-Resistenz (IC_{50} 1857,9 nM), die niedrigste Resistenz besitzt Arg58Gly mit einer IC_{50} von 85 nM. Alle errechneten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 3.4 festgehalten.

3.3.2.4 VKORC1-Mutationen in Kontaktfläche III**Abb. 3.18: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der Kontaktfläche III.**

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0 µM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Ile123Asn (marineblau), Leu128Arg (grün), Tyr139His (rot).

3. Ergebnisse

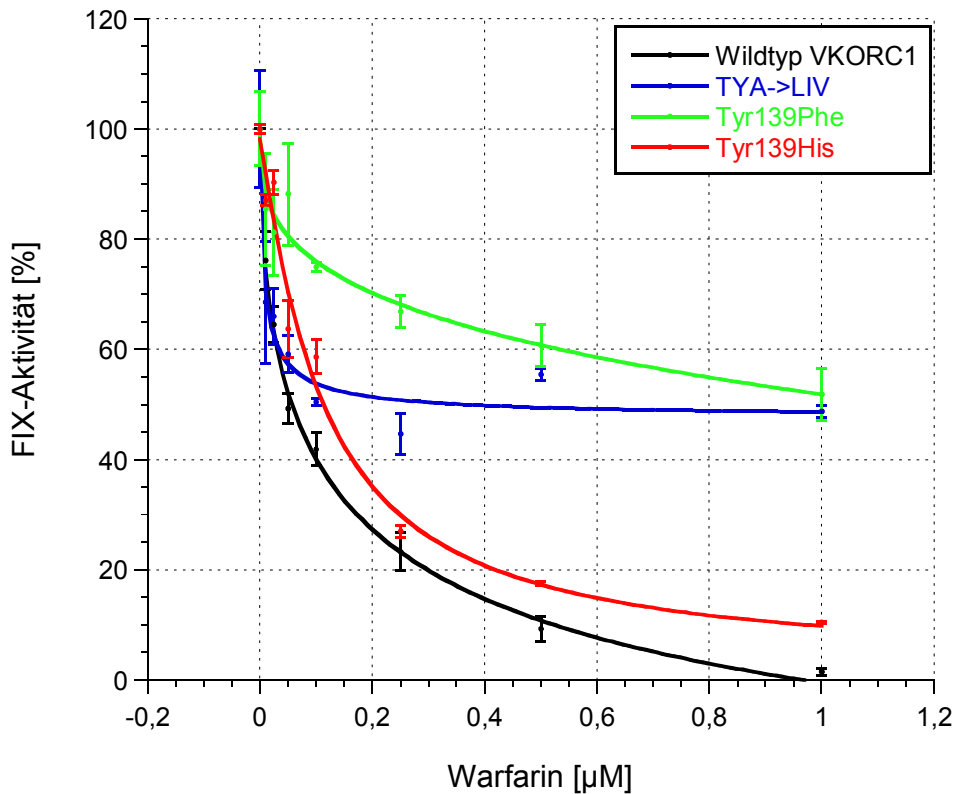


Abb. 3.19: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Varianten im TYA-Motiv.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0µM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: TYA>LIV (marineblau), Tyr139Phe (grün), Tyr139His (rot).

In der Kontaktfläche III besitzt die hVKORC1-Variante Leu128Arg die höchste Warfarin-Resistenz (IC_{50} 1226,4 nM), die niedrigste Resistenz besitzt Tyr139His (IC_{50} 113,1 nM). Alle errechneten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 3.4 festgehalten.

3.3.2.5 VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche angehören

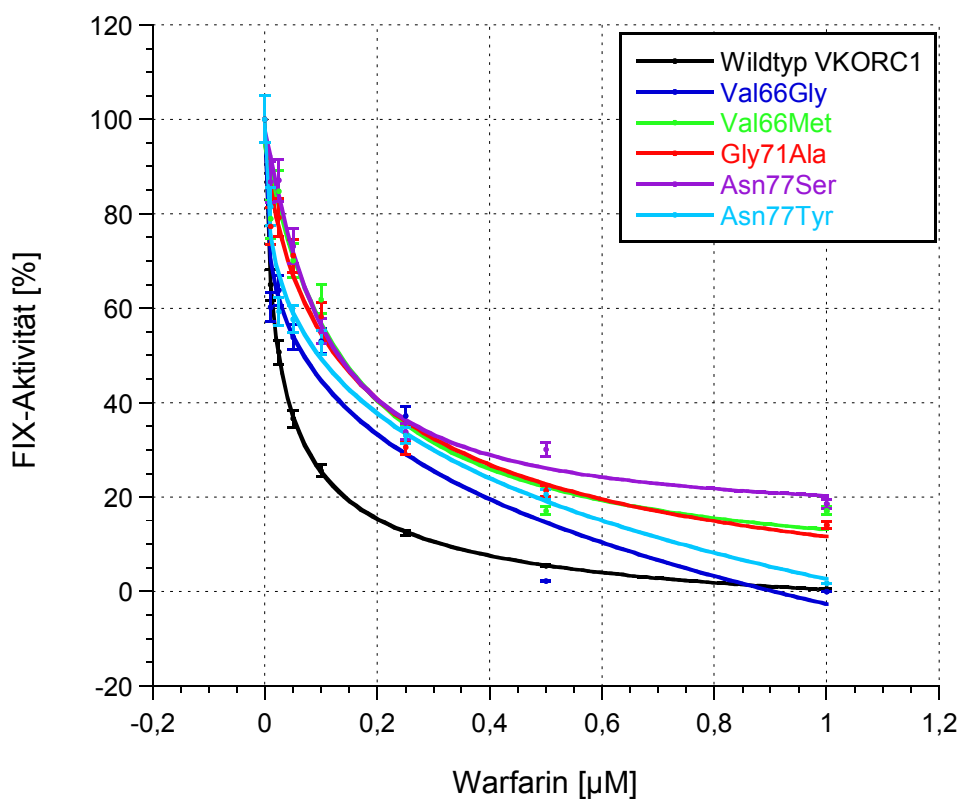


Abb. 3.20: Dosis-Wirkungs-Kurve von VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden können.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der jeweiligen VKORC1-Varianten stellen die gemessene FIX-Aktivität in Abhängigkeit der Warfarin-Konzentrationen dar (0,0 -1,0µM). Die schwarze Kurve entspricht der FIX-Aktivität der koexprimierten wildtyp VKORC1. Die FIX-Aktivitäten der koexprimierten Mutation sind in den entsprechend angegebenen Farben dargestellt: Val66Gly (marineblau), Val66Met (grün), Gly71Ala (rot), Asn77Ser (violett) und Asn77Tyr (hellblau).

Von den VKORC1-Mutationen die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden konnten besitzt die Mutation Val66Met (IC_{50} 133,6 nM) die höchste Warfarin-Resistenz und die niedrigste Resistenz Val66Gly (IC_{50} 68,9 nM). Alle errechneten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 3.4 festgehalten.

3.3.3 IC₅₀-Werte

Die IC₅₀ stellt die Konzentration an Warfarin dar, die für eine halbmaximale Inhibition der VKORC1 benötigt wird und wurde für jede Mutation anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven rechnerisch ermittelt. Parallel dazu wurden die IC₅₀-Werte jeder VKORC1-Variante durch die wt VKORC1 multipliziert, um das Vielfache der Konzentration im Vergleich zur wt VKORC1 zu ermitteln. Zusätzlich wurden die verfügbaren Patientendaten in HDT-Vielfache (high-dosage threshold) zusammengestellt. Das HDT-Vielfache stellt das Vielfache der Patientendosis im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv dar, welches aus therapeutisch stabil antikoagulierten Patienten besteht (n=77), die keine Mutation in der VKORC1 tragen. Schließlich wurden zum Vergleich der beiden Methoden die bisher publizierten Daten, die mit dem „klassischen“ VKOR-DTT Assay generiert wurden, in die Tabelle 3.2 eingefügt.

Tab. 3.4: IC₅₀-Werte aller cumarinresistenter VKORC1-Varianten.

Die halbmaximale Konzentration (IC₅₀) an Warfarin wurde für jede Mutation anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve errechnet (zweite Spalte). Zusätzlich ist in der dritten Spalte das Vielfache der Warfarin-Konzentration im Vergleich zur koexprimierten wt hVKORC1 angegeben, um diese mit der mittleren Patientendosis in HDT-Vielfachen vergleichen zu können (vierte Spalte). Bei der wt VKORC1 und den Mutationen Val29Leu, Val45Ala und Leu128Arg ist die aus dem VKOR-DTT Assay errechnete IC₅₀ nach Rost *et al.*** in der zweiten Spalte in Klammern gesetzt.^[2,66] Zusätzlich ist in der letzten Spalte aus der Publikation von Hodroge *et al.** angegeben, ob die jeweilige VKORC1-Variante in Hefe exprimiert werden konnte, VKOR-Aktivität oder einen höheren K_i-Wert im VKOR-DTT Assay besaß.^[55]

VKORC1-Variante	VKORC1/FIX Assay Warfarin IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ Variante/ IC ₅₀ wt	Mittlere Patientendosis in HDT Vielfache [Medikament]	VKOR-DTT Assay (Hodroge <i>et al.</i> *)
Wildtyp	24,7 (3034,8)**		1,0 [alle Medikamente] (n=77)	
Ala26Thr	73,7	2,98	>2,0 [P] (n=1)	keine Resistenz
Ala26Pro	1224,0	49,55	>3,0 [W] (n=1)	11,2-fach erhöhter K _i
Leu27Val	62,3	2,52	>3,0 [F], 1,0 [W] (n=1), CYP2C9*2*3	keine Resistenz
His28Gln	71,6	2,89	3,5 [P] (n=1)	keine Resistenz
Val29Leu	136,4 (220)**	5,52	2,0 [W] (n=1)	nicht exprimiert

3. Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.4: IC₅₀-Werte aller cumarinresistenter VKORC1-Varianten.

VKORC1-Variante	VKORC1/FIX Assay Warfarin IC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ Variante/ IC ₅₀ wt	Mittlere Patientendosis in HDT Vielfache [Medikament]	VKOR-DTT Assay (Hodroge et al.*)
Wild-typ	24,7 (3034,8)**		1,0 [alle Medikamente] (n=77)	
Asp36Gly	78,1	3,16	3,0 [W] (n=1)	keine Resistenz
Asp36Tyr	92,8	3,76	1,5 – 3,5 [W] für +/- (n=10) 2,0 - 5,0 [W] für ++ (n=3)	keine Resistenz
Val45Ala	152 (457,7)**	6,15	>2,0 [W] (n=1)	keine Resistenz
Ser52Leu	182,2	7,38	>3,0 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Ser52Trp	139,5	5,65	3,5 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Val54Leu	111,8	4,53	1,5 – 5,5 [W] (n=2)	4,6-fach erhöhter K _i
Ser56Phe	166,8	6,75	>5,0 [P] (n=1)	keine Resistenz
Arg58Gly	85,0	3,44	5,0 [W] (n=1)	keine Resistenz
Trp59Arg	433,0	17,53	7,0 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Trp59Cys	187,6	7,60	>3,5 [P] (n=1)	keine Resistenz
Trp59Leu	1857,9	75,22	>5,0 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Val66Gly	68,9	2,79	2,5 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Val66Met	133,6	5,41	3,0 – 6,0 [W] (n=7)	keine VKOR-Aktivität
Gly71Ala	126,5	5,12	>2,0 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Asn77Ser	131,0	5,30	>3,0 [P] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Asn77Tyr	95,6	3,87	3,5 [W] (n=1)	keine VKOR-Aktivität
Ile123Asn	209,0	8,46	>7,0 [P] (n=1)	2,4-fach erhöhter K _i
Leu128Arg	1226,4 (399,9)**	49,65	>4,0 – 7,0 [W] (n=5)	keine VKOR-Aktivität
Tyr139His	113,1	4,58	>3,0 [W] (n=1)	3,6-fach erhöhter K _i
Tyr139Phe	1139,6	46,14	-	-
TYA→LIV	360,7	14,60	-	-

Die errechnete IC_{50} für die wt VKORC1 beträgt in der neuen Methode 24,7 nM und ist wesentlich geringer als die ermittelte IC_{50} für die wt VKORC1 aus dem VKOR-DTT Assay (3034,8 nM). Alle untersuchten Mutationen besitzen in der neuen zellbasierten Methode einen höheren IC_{50} -Wert als die ermittelte IC_{50} für die wt hVKORC1, so dass alle untersuchten VKORC1-Varianten in dem neuen Assay eine Resistenz zeigen. Die niedrigste IC_{50} von 62,3 nM besitzt die Mutation Leu27Val, die höchste Resistenz mit einer IC_{50} von 1857,9 nM besitzt die Mutation Trp59Leu (Tab. 3.4).

3.4 Untersuchung zur VKORC1-Enzymhemmung

Um eine Coumarinüberdosierung zu simulieren und die antagonisierenden Eigenschaften des Vitamin K näher zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit dem bicistronischen Vektor (wt *VKORC1/F9*) transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin K₁ und Warfarin behandelt.

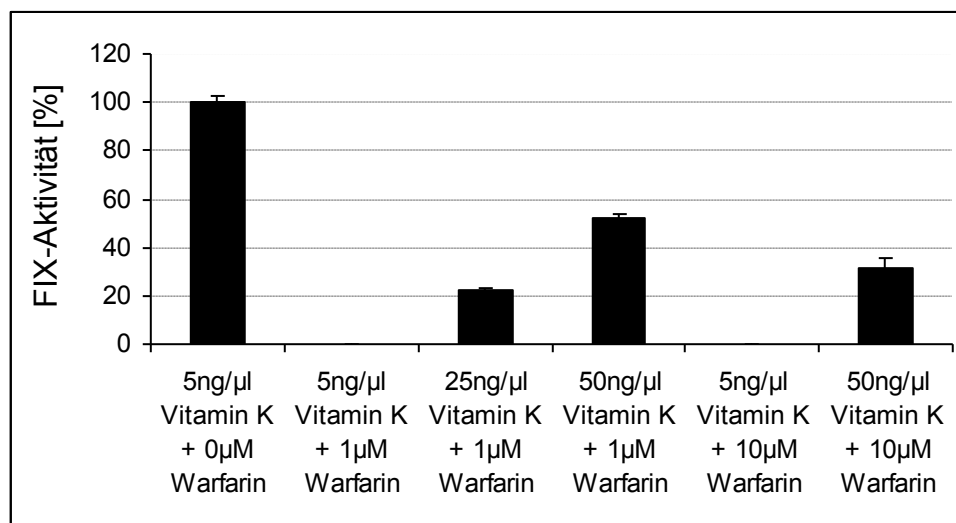


Abb. 3.21: FIX-Aktivitäten von mit wt *VKORC1* und *F9* cDNA transfizierten HEK293T-Zellen unter verschiedenen Vitamin K₁ und Warfarin-Bedingungen.

Mit wt *VKORC1* und *F9* cDNA transfizierte HEK293T-Zellen wurden entweder unter Standardbedingungen (5 ng/µl Vitamin K₁) oder mit je 5, 25, 50 ng/µl Vitamin K₁ zusammen mit 1 oder 10 µM Warfarin kultiviert.

HEK293T-Zellen, die mit dem bicistronischen Vektor (wt *VKORC1/F9*) transfiziert wurden, zeigen keine FIX-Aktivität, wenn sie ohne Vitamin K₁ kultiviert werden. Durch die Zugabe von 5 ng/µl Vitamin K₁ im Medium besitzen die Zellen eine absolute Aktivität von 45%, die in Abb 3.21 als 100% Aktivität (relative Aktivität) gesetzt wurde. Eine zusätzliche Gabe von 1 µM Warfarin im Medium resultiert in 0% FIX-Aktivität. Wird die Konzentration an Vitamin K₁ auf 25 bzw. 50 ng/µl erhöht und die Zellen zusammen mit 1 µM Warfarin inkubiert, so ist wieder eine relative FIX-Aktivität von 22% bzw. 52% messbar. Bei einer höheren Warfarinkonzentration von 10 µM ist in dem Ansatz, der zusätzlich mit 5 ng/µl Vitamin K₁ inkubiert wurde, keine FIX-Aktivität im Überstand messbar. Mit *F9* und *VKORC1* cDNA kotransfizierte Zellen, die mit 10 µM Warfarin und 50 ng/µl Vitamin K₁ kultiviert wurden besitzen eine relative FIX-Aktivität von 30%.

3.5 Untersuchungen zum Bypass des Vitamin K-Zyklus

Zur Klärung, ob NQO1 und/oder VKORC1L1 für den Bypass des Vitamin K-Zyklus verantwortlich sind, wurden basierend auf der neuen Methode Untersuchungen in HEK293T-Zellen (Abschnitt 3.5.1) sowie in Insektenzellen (Abschnitt 3.5.2) durchgeführt.

3.5.1 NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus in HEK293T-Zellen

In den bicistronischen Vektor wurden anstelle der *VKORC1* cDNA die cDNA von *NQO1* bzw. die der *VKORC1L1* kloniert. So entstanden bicistronische Vektoren, die neben der *F9* cDNA die cDNA der *NQO1* oder *VKORC1L1* enthielten. Die Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und mit der üblichen Menge an Vitamin K₁ (5 ng/μl), mit 5 ng/μl Vitamin K₁ und 1 μM Warfarin oder mit 1 μM Warfarin und der 10-fachen Menge an Vitamin K₁ (50 ng/μl) behandelt. Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben wurden der Überstand aufkonzentriert und die FIX-Aktivität gemessen, die als Marker für die Aktivität des jeweils kotransfizierten Enzyms diente.

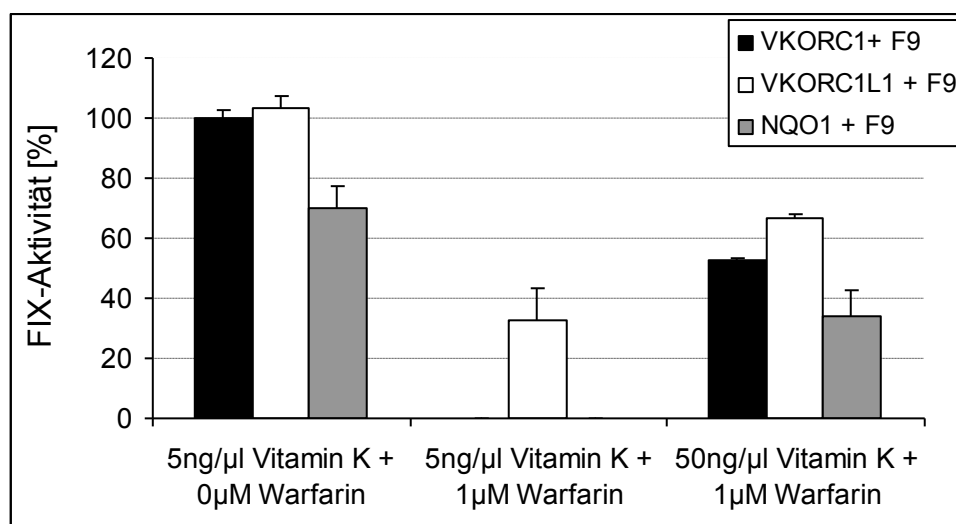


Abb. 3.22: FIX-Aktivitäten von HEK293T-Zellen die mit *F9* cDNA und *NQO1*, *VKORC1L1* oder *VKORC1* cDNA kotransfiziert wurden.

Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Vitamin K₁ und Warfarin inkubiert. Als Positivkontrolle dienen Zellen die mit *VKORC1* kotransfiziert und mit 5 ng/μl Vitamin K₁ inkubiert wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Als Positivkontrolle und Referenz wurden Zellen mit *F9* und *VKORC1* cDNA transfiziert. Die gemessene FIX-Aktivität bei der Kultivierung mit der standardisierten Menge an Vitamin K₁ (5 ng/μl) ohne Warfarin wurde als 100% Aktivität gesetzt.

Mit *VKORC1L1* cDNA kotransfizierte Zellen zeigen mit 103% Aktivität bei 5 ng/μl Vitamin K₁ im Medium vergleichbar hohe FIX-Aktivitäten wie die mit *VKORC1* cDNA kotransfizierte Zellen. HEK293T-Zellen, die mit *NQO1* kotransfiziert wurden, besitzen mit 70% eine signifikant geringere FIX-Aktivität (Abb 3.22).

Zellen, die zusätzlich zu 5 ng/μl Vitamin K₁ mit 1 μM Warfarin inkubiert wurden, zeigen bei einer Kotransfektion mit *VKORC1* und mit *NQO1* keine messbare FIX-Aktivität. Mit *VKORC1L1* kotransfizierte Zellen besitzen bei diesem Ansatz eine FIX-Aktivität von 33% (Abb 3.22).

Werden die Zellen mit der 10-fachen Konzentration an Vitamin K₁ (50 ng/μl) und 1 μM Warfarin inkubiert, ist bei allen Ansätzen FIX-Aktivität messbar. Zellen, die mit *NQO1* kotransfiziert wurden zeigen die geringste FIX-Aktivität mit 34% und mit *VKORC1* kotransfizierte Zellen eine Aktivität von 53%. Die mit *VKORC1L1* cDNA kotransfizierten Zellen besitzen die höchste Aktivität mit 67% (Abb 3.22).

3.5.2 Übertragung der neuen Methode auf Insektenzellen

Das neue System wurde auch in Insektenzellen mittels Baculovirusinfektion etabliert, um endogene Enzymaktivitäten, die den Vitamin K-Zyklus betreffen und in allen Säugertierzellen gegeben sind, zu vermeiden. Die Ergebnisse der Bypass-Untersuchungen in den HEK293T-Zellen sollten dadurch bestätigt oder widerlegt werden.

Dazu wurden Baculoviren hergestellt, die *VKORC1* Protein produzieren sowie ein bicistronischer Virus-Vektor, der *GGCX* und *F9* cDNA enthält.

Die Sf9-Zellen wurden am Tag der Infektion auf 6-well Platten verteilt und für eine Stunde zum Absetzen in den Inkubator gestellt. Vor der Infektion mit den Baculoviren wurde das Medium gewechselt, welches anstelle des Insektenserums das kohlegefilterte FBS enthielt und Vitamin K₁ (5 ng/μl). Auch hier ist es wichtig das Serum zu wechseln, da auch das herkömmliche Insektenzell-Serum signifikante Mengen an Rinder-FIX enthält und daher die Ergebnisse verfälschen würde. Nach

3. Ergebnisse

5-tägiger Inkubation der Zellen mit dem Virus wurde der Überstand abgenommen und zum Entfernen der Zellbestandteile zentrifugiert, anschließend aufkonzentriert und schließlich die FIX-Aktivität gemessen.

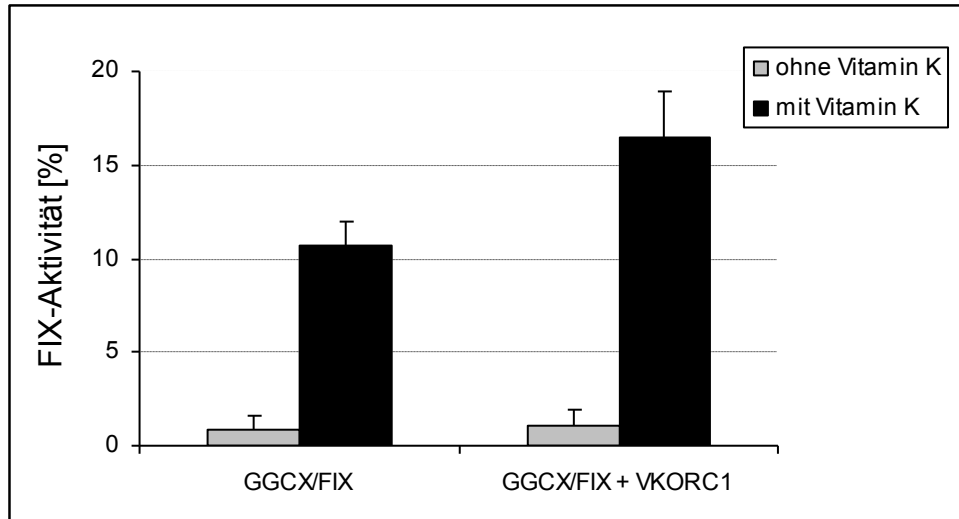


Abb. 3.23: FIX-Aktivitäten der mit Baculoviren infizierten Sf9-Zellen.

Die Zellen wurden mit dem bicistronischen Baculovirus GGCX/FIX infiziert sowie in Kombination mit einem Baculovirus für VKORC1. Als Negativkontrolle dienten infizierte Zellen, die ohne Vitamin K₁ kultiviert wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Sf9-Zellen, die allein mit dem GGCX/FIX-Virus infiziert wurden, zeigen ohne Vitamin K₁ im Medium eine FIX-Aktivität, die unterhalb 1% liegt (Abb. 3.23). Ebenso ist die FIX-Aktivität <1% in den Zellüberständen, deren Zellen zusätzlich mit VKORC1-Viren infiziert und ohne Vitamin K₁ kultiviert wurden. Werden die Zellen mit Vitamin K₁ inkubiert, besitzen die Zellen, die allein mit dem bicistronischen GGCX/FIX-Virus infiziert wurden 10% FIX-Aktivität. Die Zellen, die zusätzlich mit dem VKORC1-Virus koinfiziert wurden zeigen eine höhere FIX-Aktivität von 16,5%.

3.5.2.1 NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus in Sf9-Zellen

Um die Funktion von NQO1 und VKORC1L1 im Vitamin K-Zyklus als möglichen Bypass der VKORC1-Funktion zu untersuchen, wurden zusätzlich Baculovirus-Vektoren mit *VKORC1L1* und der *NQO1* cDNA hergestellt.

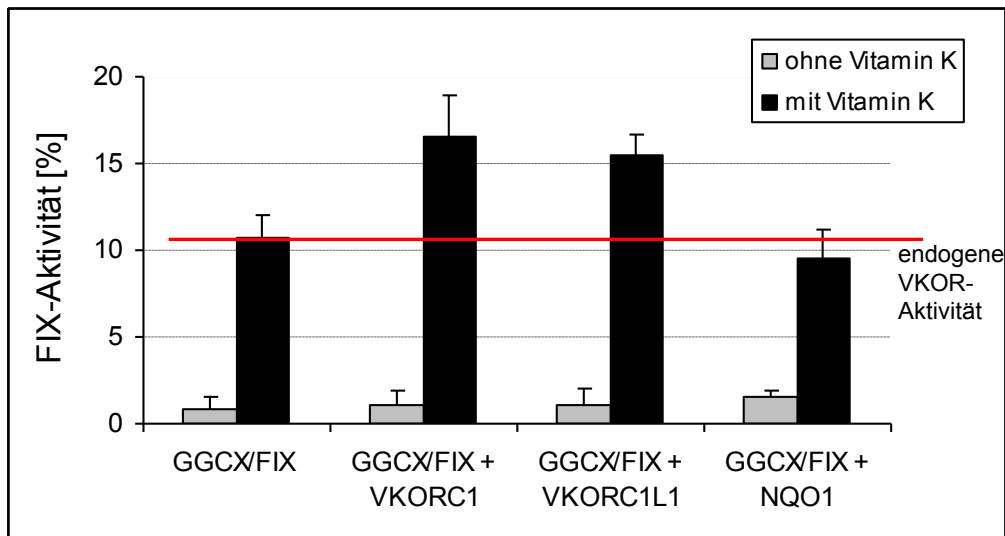


Abb. 3.24: FIX-Aktivität der mit *VKORC1*, *VKORC1L1* oder *NQO1* Baculoviren koinfizierten Sf9-Zellen.

Die Sf9-Zellen wurden mit dem Baculovirus GGCX/FIX infiziert sowie in Kombination mit den Baculoviren für *VKORC1*, *VKORC1L1* und *NQO1*. Als Negativkontrolle dienten infizierte Sf9-Zellen, die ohne Vitamin K₁ kultiviert wurden (graue Balken). Die schwarzen Balken stellen die FIX-Aktivitäten der Sf9-Zellen dar, die mit Vitamin K₁ kultiviert wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung und die rote Linie die endogene VKOR-Aktivität der Sf9-Zellen dar.

Ohne Vitamin K₁-Zusatz zeigen alle Versuchsansätze eine FIX-Aktivität unterhalb 2%. Sf9-Zellen die mit Vitamin K₁ (5 ng/μl) kultiviert und mit GGCX/FIX Virus infiziert wurden, besitzen eine FIX-Aktivität von 10%. Zusätzlich mit *NQO1* koinfizierte Zellen besitzen eine vergleichbare FIX-Aktivität von 9,5%. Sf9-Zellen, welche zusätzlich zum GGCX/FIX-Virus mit *VKORC1L1*-Virus infiziert wurden besitzen 15,5% FIX-Aktivität.

Als Positivkontrolle dienten Zellen, die zusätzlich mit dem *VKORC1*-Virus infiziert wurden. Dieser Versuchsansatz besitzt die höchste FIX-Aktivität mit 16,5%.

4 Diskussion

Die Cumarintherapie ist wegen der hohen Häufigkeit an Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der geringen Kosten trotz der neuen oralen Antikoagulantien weiterhin von großer Bedeutung. Seit der Entdeckung der VKORC1, dem Targetmolekül der Cumarine, ist der Wirkmechanismus der cumarin-basierten oralen Antikoagulation weitgehend geklärt. Allerdings wurden seither 24 Mutationen in der *VKORC1* identifiziert, die die Ursache von Cumarinresistenzen darstellen. Warum diese Mutationen zu einer Resistenz führen, bzw. welcher Mechanismus dahinter steht, ist bisher unverstanden. Ebenso ist nicht vollständig geklärt, wie und wo die Cumarine an die VKORC1 binden.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine neue Methode zur Messung der VKORC1-Aktivität cumarinresistenter Mutationen etabliert, da die im bisher verwendeten VKOR-DTT Assay ermittelten Ergebnisse nicht mit dem Patientenphänotyp übereinstimmen.

Zusätzlich wurden alle bekannten humanen *VKORC1*-Mutationen mit der neuen Methode auf ihren Warfarin-Resistenzgrad hin untersucht. Neben den standardisierten Daten für jede Mutation wurden neue Aminosäuren in der hVKORC1 entdeckt, die in der Cumarininhibierung eine wichtige Rolle spielen. Ebenfalls wurde eine Hypothese über den Mechanismus aufgestellt, wie und wo Cumarine die hVKORC1 blockieren und dies durch ein zusätzliches Proteinmodell unterstützt.

Schließlich wurde mit Hilfe der neuen Methode die Funktion der NQO1 und der VKORC1L1 als potentielle Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus in HEK293T-Zellen sowie in Insektenzellen untersucht und dadurch ihre Funktion im klassischen Vitamin K-Zyklus näher charakterisiert.

4.1 Vor- und Nachteile des neuen VKOR-Assays

Die neue Methode zur Messung der VKOR-Aktivität ist gut geeignet, um cumarinresistente Mutationen in der *VKORC1* zu untersuchen. Durch die Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem bicistronischen Vektor wird *VKORC1* und FIX in den Zellen exprimiert. Die GGCX sowie relevante Reduktionspartner der *VKORC1* (PDIs oder möglicherweise andere unbekannte Proteine, die die *VKORC1* reduzieren können) sind endogen ausreichend in den HEK293T-Zellen vorhanden.^[69] Somit sind in dem neuen Assay Bedingungen für einen funktionalen Vitamin K-Zyklus geschaffen, in dem der FIX als physiologischer Marker für die *VKORC1*-Funktion dienen kann.

4.1.1 Experimentelle Einflussfaktoren der neuen Methode

Das Messsystem ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

1. von dem Substrat (Vitamin K),
2. den endogenen Enzymen wie GGCX und den Reduktionspartnern der *VKORC1*,
3. der Expression und Aktivität der *VKORC1* sowie
4. der Expression des FIX.

Die Substratbedingungen sind in der Methode stets gleich gehalten (5 ng/ μ l Vitamin K₁) und ausreichend, um aktiven FIX im Medium messen zu können.^[70] Ebenso wurden alle Experimente mit derselben Zelllinie durchgeführt, so dass die Expression der endogenen Enzyme in jedem experimentellen Ansatz ebenfalls gleich bleibend ist. Von HEK293T-Zellen ist zudem bekannt, dass sie den FIX endogen nicht exprimieren, sich jedoch sehr gut für eine Expression von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren eignen.^[71-73] Weiterhin zeichnen sich HEK293T-Zellen im Allgemeinen durch eine hohe Transfektionsrate, hohe Effizienz an posttranslationaler γ -Carboxylierung der VKD-Proteine und eine effiziente Propeptid-Abspaltung aus. Auch ist bekannt, dass die *VKORC1* der Flaschenhals des Vitamin K-Zyklus ist und somit sollte das System fast ausschließlich von der Expression und Funktionalität der *VKORC1* abhängig sein.^[74] Da die Substratbedingungen und die Zelllinie in dem neuen Assay konstant sind, ist das System letztlich nur von der

Expression und Aktivität der VKORC1 und des FIX abhängig. Die Western Blots zeigen, dass die Expression der VKORC1-Varianten vergleichbar oder höher mit der der koexprimierten wt VKORC1 ist. Daher haben die jeweiligen Mutationen in der *VKORC1* keine Auswirkung auf die Expression der VKORC1 (Abb. 3.7–3.11). Auch die Zugabe von Warfarin hat keinen Einfluss auf die Expression der Proteine. Die FIX-Antigenlevel zeigen für die ausgewählten VKORC1-Varianten, die nur mit Vitamin K₁ behandelt wurden, eine Expression von über 100% FIX (Abb. 3.12). Diese sinken bis zu 33% (bei der wt VKORC1) bei Zugabe von 1 µM Warfarin. Dies kann auf die erniedrigten Level an aktivierten FIX zurückgeführt werden. Bei den Dosis-Abhängigkeits-Kurven zeigt auch die zur Kontrolle koexprimierte wt VKORC1 die stärkste Reduktion an aktivem FIX bei 1µM Warfarin im Vergleich zum Ausgangswert von 0 µM Warfarin. Die Bestimmung der FIX-Antigenlevel wurde wie für die VKORC1-Western Blots nur als Expressionskontrolle durchgeführt, da der gemessene aktivierte FIX als Marker für die jeweilige VKORC1-Aktivität dient. Da durch den bicistronischen Vektor ein einzelnes mRNA-Molekül für beide Proteine transkribiert wird, ist gewährleistet, dass *VKORC1* und *F9* im selben Verhältnis transkribiert und translatiert werden.^[75]

4.1.2 Vergleich zwischen der neuen Methode und dem VKOR-DTT Assay

Im Vergleich zu dem „klassischen“ VKOR-DTT Assay müssen in der neuen Methode keine unphysiologischen Detergenzien wie CHAPS und Reduktionsmittel wie DTT verwendet werden, welche die Warfarininhibierung nachweislich beeinflussen und auch in falsch positiven sowie falsch negativen Ergebnissen resultieren können.^[2,17,18,55] VKOR-Aktivitätsuntersuchungen mit dem membranpermeablen DTT und einem nicht membrangängigen Reduktionsmittel (*E.coli* Trx) zeigten vergleichbar hohe Aktivitäten für die wt VKORC1. Jedoch besitzen die VKORC1-Varianten Cys43Ala und Cys51Ala nur mit DTT als Reduktionsmittel Aktivität, mit *E.coli* Trx hingegen nicht. Dies zeigt deutlich, dass DTT falsch positive Aktivitäten im VKOR-DTT Assay erzeugen kann und dass die Cysteine im ER-luminalen Loop wichtig für eine funktionelle VKORC1 sind.^[17,18,58] In der neuen zellbasierten Methode werden weder DTT noch andere unphysiologische Detergenzien verwendet, die die VKORC1-Aktivität falsch positiv beeinflussen könnten. Die endogen vorhandenen

Enzyme der HEK293T-Zellen reichen für die Reduktion des aktiven Zentrums der VKORC1 aus, so dass die VKORC1 unter nahezu physiologischen Umständen ihr Substrat reduzieren kann. Lediglich das verwendete Vitamin K₁ ist in DMSO gelöst und Warfarin in Ethanol. Die resultierenden Endkonzentrationen von 0,0061% DMSO und 0,02% Ethanol sind für alle verwendeten Vitamin K₁- und Warfarin-Konzentrationen in allen Experimenten gleich, liegen weit unterhalb der Toxizitätsgrenze und beeinflussen die Viabilität der Zellen nicht.

Des Weiteren sind die Mengen an Warfarin, die für eine Inhibierung der VKORC1 eingesetzt werden, im zellbasierten Assay um ein Vielfaches geringer als im VKOR-DTT Assay (0,01-1 µM versus 5-100 µM). Somit ist die neue Methode gegenüber Warfarin wesentlich sensitiver als der „klassische“ VKOR-DTT Assay. Auch ist die gemessene IC₅₀ für die wt VKORC1 im zellbasierten Assay mit 24,7 nM Warfarin deutlich geringer als die im VKOR-DTT Assay gemessene IC₅₀ von 3034,8 nM. Daher entspricht die im neuen Assay gemessene IC₅₀ vermutlich eher dem physiologisch richtigen Wert für die Inhibierung der wt VKORC1.

Generell sollte die IC₅₀ der endogenen VKORC1 der IC₅₀ der kotransfizierten VKORC1 entsprechen. In unserem Assay ist allerdings die IC₅₀ der endogenen VKOR-Aktivität von 0,37 nM wesentlich niedriger (Abb. 3.14). Vermutlich spiegelt die IC₅₀ der endogenen VKOR auch die Aktivität anderer endogener Reduktasen wieder, so dass die IC₅₀ der kotransfizierten VKORC1 eher der IC₅₀ für die hVKORC1 entspricht, da diese überexprimiert wurde.

Werden die Ergebnisse der neuen Methode mit denen der im VKOR-DTT Assay generierten Daten verglichen, so unterscheiden sich diese ebenfalls voneinander (Tab. 3.2).^[2,55] Die im VKOR-DTT Assay untersuchten VKORC1-Varianten besitzen meistens keine VKOR-Aktivität oder teilweise stark reduzierte Ausgangsaktivitäten mit berechneten IC₅₀-Werten, die deutlich unterhalb der IC₅₀ der wt VKORC1 liegen.^[2,20,55,66] Neueste Arbeiten, in denen alle cumarinresistente VKORC1-Varianten in Hefe (*Pichia pastoris*) exprimiert und anschließend im VKOR-DTT Assay untersucht wurden, zeigen sogar, dass nur vier von 25 Mutanten eine Resistenz besitzen. Die restlichen 19 VKORC1-Varianten konnten entweder nicht exprimiert werden, besaßen keine VKOR-Aktivität oder keine Resistenz.^[55] Diese Daten

stimmen nicht mit dem beschriebenen Phänotyp von Patienten überein, die eine dieser Mutationen in der *VKORC1* tragen. Cumarinresistente Mutationen in der *VKORC1* sind dadurch charakterisiert, dass sie resistent und demnach schlecht durch Cumarine inhibierbar sind. Eine Aktivitätsminderung in der *VKORC1* und einen daraus resultierenden Blutungsphänotyp ist bei diesen Patienten nicht bekannt.^[52] Selbst Patienten mit einem homozygoten Asp36Tyr Genotyp zeigen keine Anzeichen für eine Koagulopathie.^[76] Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Mutationen nicht die Funktion der *VKORC1* beeinträchtigen. Weder der Elektronentransfer noch die Substratbindung scheinen durch die Mutationen beeinflusst zu werden, sondern allein das Bindungsverhalten bezüglich der Cumarine. Dass weder die Expression der *VKORC1* noch die Stabilität bzw. der Abbau des Proteins durch die Mutation verändert wird, ist deutlich im Western Blot zu erkennen. Die Expression ist für jede *VKORC1*-Variante vergleichbar zu der Expression des wt Proteins. Des Weiteren besitzen im Gegensatz zum *VKOR*-DTT Assay alle Mutationen in dem neuen zellbasierten Assay bei 0 μ M Warfarin Ausgangsaktivitäten, die sich nicht wesentlich vom koexprimierten wt unterscheiden und eine IC_{50} , die höher ist als die der koexprimierten wt *VKORC1*. Da die Dosis-Wirkungs-Kurven aller untersuchter Mutationen oberhalb der Kurve der kotransfizierten wt *VKORC1* liegen, konnte nachgewiesen werden, dass alle *VKORC1*-Varianten in dem neuen Assay eine Resistenz gegenüber Warfarin zeigen. Die ermittelten Resistenzgrade stimmen zudem mit dem beschriebenen Patientenphänotyp überein (Tab. 3.2, Abb. 3.14-3.21 nähere Diskussion der einzelnen Mutationen siehe Abschnitt 4.3.1-4.3.4).

4.1.3 Spezifische *VKORC1*-Aktivität im neuen Assay

Ein wesentlicher Nachteil der neuen Methode ist, dass die spezifische *VKORC1*-Aktivität der koexprimierten Varianten nicht ermittelt werden kann. Dies liegt zum einen daran, dass ein Surrogat-Marker (aktiver FIX) zur Messung der *VKORC1*-Aktivität verwendet wird und zum anderen daran, dass die endogene *VKOR*-Aktivität der HEK293T-Zellen mit gemessen wird. Bei 0 μ M Warfarin zeigt keine Mutante im Vergleich zur koexprimierten wt *VKORC1* eine reduzierte FIX-Aktivität. Werden allerdings HEK293T-Zellen allein mit *F9* cDNA transfiziert (ohne zusätzliche

VKORC1 cDNA), so ist die FIX-Aktivität der endogenen VKOR bei 0 μ M Warfarin vergleichbar mit der der koexprimierten wt *VKORC1*. Die Frage ist, ob das System mit der endogenen VKOR-Aktivität bereits gesättigt ist und ob die endogene *VKORC1* mögliche Aktivitätsminderungen der koexprimierten *VKORC1*-Varianten kompensieren kann. Daher könnte der neue Assay dadurch limitiert sein, dass reduzierte Aktivitäten der jeweiligen koexprimierten *VKORC1*-Varianten nicht detektiert werden können. Allerdings gilt dies ausschließlich für die Betrachtung der Ausgangs-Aktivitäten, d.h. bei den Ansätzen die nicht mit Warfarin (0 μ M) behandelt wurden. Da die endogene VKOR-Aktivität in allen Versuchsansätzen gleich ist, kann sie als „Hintergrund-Aktivität“ angesehen werden. Sie ist allerdings nicht hinderlich für die Untersuchung cumarinresistenter Mutationen, da die Effektivität des Warfarins nicht durch die endogene VKOR-Aktivität der Zellen beeinflusst wird. Schon bei der Zugabe der geringsten Warfarin-Konzentration weisen resistente *VKORC1*-Varianten stets eine höhere FIX-Aktivität auf als die endogene und die koexprimierte wt *VKORC1*.

Zusammenfassend eignet sich die neue Methode wesentlich besser als der bekannte VKOR-DTT Assay zur Untersuchung von *VKORC1*-Mutationen hinsichtlich ihrer Cumarinresistenz. Alle untersuchten Mutationen zeigen in unserem Assay eine Warfarinresistenz, die von einem milden bis zu einem kompletten Resistenzphänotyp reichen. Zusätzlich werden mit diesem Assay die Resistenz-Phänotypen, wie sie für die jeweilige Mutation im Patienten beschrieben sind, widergespiegelt.

4.2 Neue Hypothesen zur Warfarinbindung

Die meisten Mutationen der humanen VKORC1, die zu einer Cumarinresistenz führen, befinden sich im großen periplasmatischen Loop zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (TM1, TM2).^[16,52] In unserem Proteinmodell der hVKORC1 befinden sich 16 von insgesamt 24 Mutationen in diesem Abschnitt. Wenige Mutationen befinden sich im verbleibenden Protein, davon fünf in TM1, eine in der dritten TM-Domäne (TM3), eine zwischen TM3 und der vierten TM-Helix (TM4) und eine weitere in TM4. Alle diese transmembranären Mutationen sind zudem auf der periplasmatischen Seite des Enzyms lokalisiert. Die Verteilung der Mutationen ist ein Hinweis darauf, dass nicht allein das TYA-Motiv in TM4 für die Cumarinbindung verantwortlich sein kann. Cumarine scheinen die VKORC1 durch Interaktionen mit dem Loop und den ER-luminal gewandten Anteilen der VKORC1 zu inhibieren. Die zytoplasmatischen Anteile der TM-Domänen scheinen nicht an der Warfarininhibierung beteiligt zu sein, da hier keine einzige Mutation bekannt ist, die zu einer Cumarinresistenz führt.

Es gibt drei Möglichkeiten, wie Warfarin die VKORC1 inhibieren könnte. Warfarin könnte durch eine Bindung an den Loop verhindern, dass die Cysteine Cys43 und Cys51 durch PDIs reduziert werden. Auch könnte durch die Bindung an den periplasmatischen Loop der Elektronentransfer vom Cys51 zum CXXC-Motiv unterbunden werden. Beide Fälle würden zum Aktivitätsverlust der VKORC1 führen und Vitamin K könnte nicht reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Warfarin das aktive Zentrum blockiert und die Bindung von Vitamin K verhindert. Auch hier wäre die Konsequenz, dass VKORC1 Vitamin K nicht reduzieren kann. Theoretisch könnte Warfarin den Elektronentransfer und gleichzeitig die Substratbindung blockieren. Alle drei Möglichkeiten führen zu einem Aktivitätsverlust der VKORC1.

4.2.1 Drei potentielle Warfarinbindungsstellen in der VKORC1

Angelehnt an die bekannte Kristallstruktur des bakteriellen VKOR Homologs (*Synechococcus sp.*) wurde ein Proteinmodell für die humane VKORC1 erstellt.^[16] Weitere Simulationen mit Warfarin als Bindungspartner ergaben drei Kontaktflächen in der VKORC1, mit denen Warfarin interagiert (Abb. 3.3). Die Kontaktfläche I befindet sich im periplasmatischen Anteil der TM1 der VKORC1 (Leu22 - Val29), eine weitere betrifft die 3_{10} -Helix im großen periplasmatischen Loop zwischen TM1 und TM2 (Ser52 - Phe55) und die dritte Kontaktfläche ist in TM4 lokalisiert (Phe131 - Thr137; Tab. 3.2). Interessanterweise liegen fast alle bekannten Mutationen, die zu einer Cumarinresistenz führen, in einer dieser Kontaktflächen oder befinden sich in deren Nähe. Auch das bekannte Warfarinbindungsmotiv, das TYA-Motiv, ist über drei Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren in der Kontaktfläche III verbunden.

Da fast alle Mutationen in oder um diese simulierten Kontaktflächen auftreten und auch nachweislich im Patienten sowie im *in vitro* Assay zu einer Warfarinresistenz führen, spricht dies sehr dafür, dass die Simulation ein realitätsnahes Modell ist und die drei ermittelten Kontaktflächen in der hVKORC1 für die Warfarinbindung verantwortlich sind.

Alle untersuchten VKORC1-Varianten werden in dieser Arbeit entsprechend ihrer Lokalisation in die Gruppen der jeweiligen Kontaktflächen I-III eingeteilt und diskutiert (Abschnitt 4.3.2 - 4.3.4).

4.2.2 Ist das TYA-Motiv für die Warfarinbindung verantwortlich?

Ein spezifisches Bindungsmotiv für Warfarin ist in der VKORC1 bisher nicht eindeutig charakterisiert worden. Allerdings konnte in der ebenfalls cumarinsensitiven NQO1 durch Photoaffinitäts-Markierungen eine Dicumarolbindungsstelle identifiziert werden, das sogenannte TYA-Motiv.^[13,19,77,78] Auch die VKORC1 besitzt ein homologes TYA-Motiv, welches eine wichtige Rolle in der Cumarinbindung zu spielen scheint, da Mutationen in Nagern an der Stelle Tyr139 in diesem Motiv bekannt sind, die zu einer Resistenz führen.^[17,20] Bekräftigt wird diese Annahme dadurch, dass eine der drei bekannten murinen Mutationen im TYA-Motiv (Tyr139Phe) eine komplette Warfarin-

Resistenz und die Mutation Tyr139Cys und Tyr139Ser einen hohen Resistenzgrad im VKOR-DTT Assay aufweisen.

Um die Bedeutung des TYA-Motivs (Threonin, Tyrosin, Alanin) für die Cumarinbindung näher zu untersuchen, wurde das komplette Bindungsmotiv zu Leucin, Isoleucin und Valin mutiert (LIV). Diese Aminosäuren wurden ausgesucht, da sie keine funktionellen Gruppen besitzten und ihre Größe vergleichbar mit den Aminosäuren des TYA-Motivs ist. Im zellbasierten Assay zeigt das komplett zu LIV mutierte TYA-Motiv mit einer IC_{50} von 360,7 nM eine totale Resistenz (verglichen mit der wt VKORC1 die 14,6-fache Warfarin-Konzentration, siehe Tab. 3.4). Interessanterweise formt die Dosis-Wirkungs-Kurve für diese Mutation ab einer Konzentration von circa 0,2 μ M - 1 μ M Warfarin ein Plateau mit einer FIX-Aktivität von 52%.

In unserem hVKORC1-Modell sind alle drei Aminosäuren des TYA-Motivs über Wasserstoffbrücken mit der dritten Kontaktfläche verbunden (Abb. 4.1). Dies erklärt, warum das komplett mutierte TYA-Motiv zu einer starken Resistenz führt, da bei dieser VKORC1-Variante keine Wasserstoffbrücken zur Kontaktfläche III ausgebildet werden können. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das gesamte TYA-Motiv eine Rolle in der Warfarinbindung spielt und Mutationen an dieser Stelle einen kompletten Warfarin-Resistenzphänotyp verursachen können.

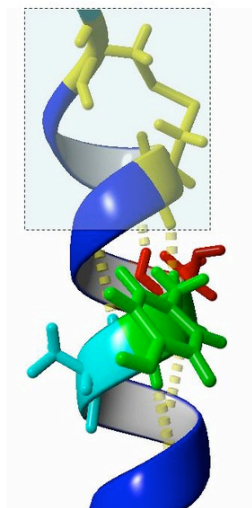


Abb. 4.1: Wasserstoffbrückenbindungen des TYA-Motivs.

Alle drei Aminosäuren des TYA-Motivs (Threonin in rot, Tyrosin in grün, Alanin in hellblau) bilden Wasserstoffbrückenbindungen zur Kontaktfläche III aus.

Trotz der hohen Frequenz an murinen Mutationen im TYA-Motiv ist nur eine humane Mutation in diesem Bereich bekannt, die zu einer Resistenz führt (Tyr139His). Da das komplett mutierte TYA-Motiv (Leucin, Isoleucin, Valin) einen starken Warfarin-Resistenzphänotyp aufweist, wurde für die Mutation Tyr139His ein vergleichbar hoher Resistenzgrad erwartet. Jedoch zeigt die Mutation Tyr139His in dem neuen VKORC1-Assay nur einen moderaten Resistenzphänotyp. Diese VKORC1-Variante besitzt eine IC_{50} von 113,1 nM. Dies ist im Vergleich zur wt VKORC1 die 4,58-fach erforderliche Konzentration an Warfarin für eine halbmaximale Inhibition. In der Literatur ist bisher nur ein Patient mit dieser Mutation beschrieben, der mit der dreifachen Menge an Phenprocoumon (63 mg/Woche) nicht therapeutisch antikoaguliert werden konnte.^[52] Nach unserem Ergebnis müsste dieser Patient mit der circa 4,5-fachen Menge an Phenprocoumon therapeutisch antikoagulierbar sein. Jedoch müssen die patientenindividuellen pharmakokinetischen und -genetischen Faktoren in diese Überlegungen mit einbezogen werden. Dies kann dazu führen, dass der Patient einen höheren oder niedrigeren Bedarf an oralen Antikoagulantien besitzt als im Assay ermittelt.

Für das betreffende Tyrosin im TYA-Motiv zeigt das Proteinmodell für die hVKORC1 eine Besonderheit auf. Tyr139 ist die einzige Aminosäure aller betreffender cumarinresistenter Mutationen, deren Seitenkette und reaktive Gruppen nicht ins Lumen sondern in die Phosphatidylcholin-Membran ragt (Abb. 4.1). Trotzdem bildet das Tyr139 eine Wasserstoffbrückenbindung zur Kontaktfläche III aus. Da sich Tyrosin und Histidin strukturell sehr ähnlich sind, beide einen aromatischen Ring besitzen und vergleichbar groß sind, bewirkt der Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Histidin im TYA-Motiv wahrscheinlich keine großen Konformationsänderung in der hVKORC1. Des Weiteren ist die Histidin-Seitenkette generell in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und kann vermutlich in der hVKORC1 anstelle des Tyrosins auch eine Wasserstoffbrückenbindung zur Kontaktfläche III ausbilden. Daher führt die VKORC1-Variante Tyr139His nicht zu einer hohen Warfarinresistenz.

Interessanterweise zeigt die murine VKORC1-Mutation Tyr139Phe im TYA-Motiv im alten VKOR-DTT Assay und im neuen Assay einen kompletten Resistenzphänotyp.^[17,20] Die IC_{50} für diese VKORC1-Variante beträgt im zellbasierten Assay 1139,7 nM und ist ein 46,14-Vielfaches der wt IC_{50} . Dieser hohe

Resistenzgrad ist wahrscheinlich auf das Fehlen der Wasserstoffbrückenbindung zur Kontaktfläche III zurückzuführen, da Phenylalanin wesentlich schlechter Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet als Tyrosin oder Histidin.

Zusammenfassend scheint das TYA-Motiv eine wichtige Rolle in der Warfarinbindung zu spielen. Dies wird anhand des kompletten Resistenzphänotyps der LIV-Variante deutlich. Jedoch führt nicht zwingend jede Mutation im TYA-Motiv zu einem kompletten Resistenzphänotyp. Die Hypothese, dass insbesondere die Hydroxylgruppe des Tyr139 in die Warfarinbindung involviert ist, kann bestätigt werden, da diese eine Wasserstoffbrückenbindung zur Kontaktfläche III ausbildet. Der moderate Resistenzphänotyp der humanen Mutation Tyr139His begründet sich darauf, dass Histidin wahrscheinlich wie Tyrosin eine Wasserstoffbrückenbindung zur dritten Kontaktfläche ausbilden kann. Andererseits können Aminosäureaustausche an derselben Stelle komplette Resistenzen verursachen, wenn keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden kann. Dies ist z.B. bei der murinen VKORC1-Variante Tyr139Phe gegeben. Schließlich ist der Resistenzgrad im TYA-Motiv nicht nur durch die Position, sondern auch durch die Art des Aminosäureaustausches und der daraus resultierenden Fähigkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung bestimmt.

Allerdings ist das TYA-Motiv nicht die einzige Aminosäuresequenz in der VKORC1, welche für die Warfarinbindung wichtig ist (siehe Abschnitt 4.3.2 - 4.3.4). Andere untersuchte Mutationen zeigen vergleichbare oder deutlich ausgeprägtere Resistenzgrade, so dass auch andere Aminosäuren der hVKORC1 an der Warfarinbindung beteiligt sein müssen.

4.2.3 Bindet Warfarin irreversibel an die VKORC1?

Über das chemische Bindungsverhalten der Cumarine an die VKORC1 ist wenig bekannt. Seit 1980 wird angenommen, dass Cumarine eine kovalente, irreversible Bindung mit der VKORC1 eingehen und somit nicht kompetitive Inhibitoren sind.^[27,56] Dieser Schluss wurde aus Experimenten mit Lebermikrosomen aus Ratten, die im VKOR-DTT Assay untersucht wurden, gezogen. Mikrosomen, die mit Warfarin inkubiert wurden, zeigten dieselbe Aktivität wie mit Warfarin behandelte Mikrosomen, die jedoch anschließend 3-mal mit Tris-KCl Puffer [20mM] gewaschen wurden. Es ist jedoch fraglich, ob nicht kovalent an die VKORC1 gebundenes Warfarin über diese Prozedur aus den Mikrosomen entfernt werden kann. Zudem nimmt bereits die VKOR-Aktivität bei den Warfarin-unbehandelten Mikrosomen in unerklärlicher Weise um 30% ab. Dieses Experiment zeigt somit lediglich, dass die Warfarin-Bindung an die VKORC1 wahrscheinlich stärker ist als seine Löslichkeit im Puffer und ist daher kein Beweis für eine kovalente Bindung.

Die Bindungseigenschaften von Warfarin bezüglich der VKORC1 sollte anhand der neuen Methode überprüft werden. Falls Warfarin irreversibel an die VKORC1 bindet, müsste die VKORC1 ab einer bestimmten Warfarin-Konzentration komplett inhibiert sein. Diese Inhibition müsste ungeachtet der Vitamin K-Konzentration stets bestehen bleiben.^[46] In dem neuen Assay müsste unter diesen Umständen keine FIX-Aktivität messbar sein. Die endogene sowie die koexprimierte VKORC1 ist im zellbasierten Assay bei 1 μM Warfarin komplett inhibiert (Abb. 3.22). Wird die Vitamin K-Konzentration allerdings um das 10-fache erhöht, so ist wieder 52% FIX-Aktivität messbar. Dieser Effekt kann wiederum durch höhere Gaben an Warfarin aufgehoben werden. Daher sprechen diese Ergebnisse für einen kompetitiven Mechanismus, da kompetitive Antagonisten (Warfarin) durch höhere Agonistenkonzentrationen (Vitamin K) entsprechend dem Massenwirkungsgesetz wieder verdrängt werden.

Des Weiteren ist bekannt, dass bei kompetitiver Enzyminhibition Antagonist und Agonist strukturell sehr ähnlich sind.^[46] Vergleicht man die Struktur von Vitamin K mit der des Warfarins, so ist auffällig, dass sich der Naphtochinonring des Vitamin K und das 4-Hydroxy-2H-Chromen-2-on Ringsystem des Warfarins sehr ähneln (Abb. 4.2).

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Warfarin als kompetetiver Inhibitor wirken sollte.

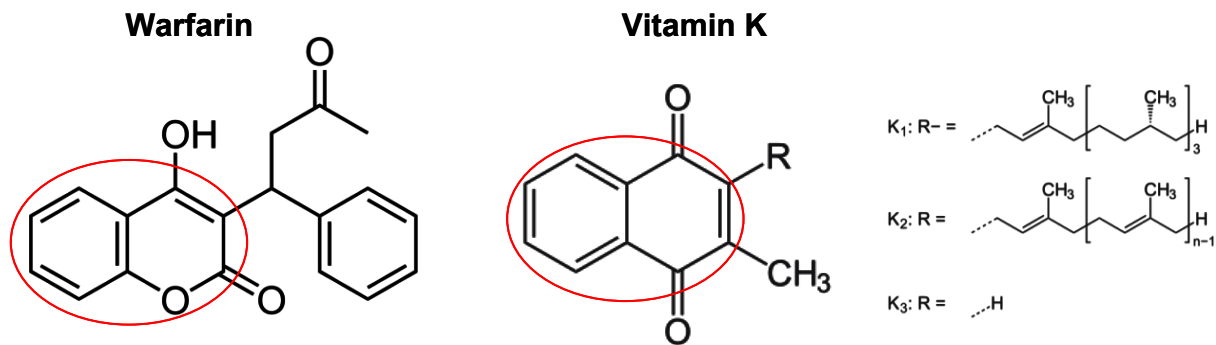


Abb. 4.2: Strukturvergleich zwischen Warfarin und Vitamin K.

In rot sind die Strukturen, die sich strukturell ähnlich sind, eingekreist. Es handelt sich dabei um den Coumarinring des Warfarins und den Naphtochinonring des Vitamin K.

Eine Simulation der Vitamin K-Bindung in unserem Proteinmodell der hVKORC1 gibt erste Hinweise darauf, dass genau die Strukturen, in denen sich das Vitamin K und das Warfarin ähneln, wahrscheinlich dieselbe Bindungsfläche in der hVKORC1 teilen. Zudem hat in diesem Modell Warfarin eine doppelt höhere errechnete Bindungsaffinität als Vitamin K₁ (7,02 kcal/mol für Warfarin, 3,63 kcal/mol für Vitamin K₁). Die höhere Affinität des Warfarins zur hVKORC1 als die des Vitamin K könnte auch erklären, warum im zellbasierten Assay die FIX-Aktivität durch höhere Gaben an Vitamin K nicht komplett rekonstituiert werden kann.

Durch die Ergebnisse des zellbasierten Assays kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein anderes endogenes Enzym für diesen Effekt verantwortlich ist, welches erst bei hohen Dosen an Vitamin K die Reduktion katalysiert und eine geringere Warfarinsensitivität besitzt.

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass Warfarin nicht wie bisher angenommen ein irreversibler Inhibitor der VKORC1 ist, sondern ein kompetetiver Antagonist sein sollte. Ein endgültiger Beweis kann jedoch nur durch knock down oder knock out Experimente erbracht werden.

4.3 Warfarin resistente VKORC1-Mutationen

Um einen Einblick in den Mechanismus der Cumarininhibition zu erhalten und zu charakterisieren, wie Aminosäureaustausche in der VKORC1 die Cumarinbindung beeinflussen, wurden alle bekannten humanen Mutationen mittels der neuen Methode untersucht. Dadurch konnten Daten für jede VKORC1-Mutation in Form von standardisierten IC_{50} -Werten generiert werden. Durch die konstanten Bedingungen sind diese unabhängig vom z.B. Promotorgenotyp sowie anderen genetischen und pharmakokinetischen Faktoren (z.B. CYP2C9 Defektallelen, Alter, Geschlecht, Interaktionen mit Medikamenten). Somit sind die IC_{50} -Werte der VKORC1-Varianten untereinander vergleichbar und die Ergebnisse der Untersuchung ein Hinweis auf den jeweiligen Resistenzgrad. Für Patienten, die nicht stabil antikoaguliert werden konnten oder deren Therapie abgebrochen wurde, können die IC_{50} -Werte des zellbasierten Assays ein guter Richtwert für die Therapie mit Cumarinen sein (Tab. 3.2, siehe dritte Spalte IC_{50} wt / IC_{50} VKORC1-Variante). Jedoch bleiben die interindividuellen Einflussfaktoren für jeden Patienten bestehen und müssen weiterhin in die Steuerung der Therapie mit Cumarinen einbezogen werden.

Anhand des Proteinmodells für die humane VKORC1 wurden drei potentielle Kontaktflächen in der hVKORC1 identifiziert, die an der Warfarinbindung beteiligt sind (Abb. 3.6). Alle bisher bekannten Mutationen liegen in einer dieser drei Kontaktflächen; einige direkt, andere in räumlicher Nähe (Tab. 3.3). Daher wurden die verschiedenen Mutationen in Gruppen eingeteilt, die durch die jeweilige beeinflusste Kontaktfläche charakterisiert werden.

4.3.1 VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche I

Die erste potentielle Kontaktstelle für die Warfarinbindung in der VKORC1 wird durch die Aminosäuren Leu22-Val29 gebildet, die sich in dem periplasmatisch zugewandten Teil der ersten Transmembranhelix (TM1) befinden. Es sind fünf Mutationen bekannt, die in der Kontaktfläche I liegen (Ala26Thr, Ala26Pro, Leu27Val, His28Gln, Val29Leu). In dieser Gruppe sind milde bis komplette Cumarinresistenzen

vertreten, wobei die Mutation His28Gln den schwächsten Resistenzgrad besitzt und die Mutation Ala26Pro mit einer kompletten Resistenz den stärksten Phänotyp zeigt.

Bei der VKORC1-Variante Ala26Pro findet ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Prolin statt. Alanin ist eine kleine Aminosäure, deren Seitenkette nicht reaktiv und somit selten in Proteinfunktionen involviert ist. Prolin ist hingegen durch seinen -60° Öffnungswinkel als sogenannter „Helixbrecher“ charakterisiert, der eine starke Konformationsänderung von alpha-Helices bewirkt. Der Aminosäureaustausch von Alanin zu Prolin scheint auch in der hVKORC1 die natürliche alpha-helikale Struktur des Proteins so stark zu beeinflussen, dass dieser zu einem hohen Warfarin-resistenzphänotyp führt. Der Bruch der alpha-Helix und die daraus resultierende Konformationsänderung der hVKORC1 scheint Warfarin sterisch an einer Bindung zu hindern. Dies weist darauf hin, dass Warfarin über die periplasmatischen Anteile der hVKORC1 agiert. Die VKORC1-Aktivität scheint durch den Aminosäureaustausch und die große Konformationsänderung nicht beeinflusst zu werden, da die Dosis-Wirkungs-Kurve überhalb der der wt VKORC1 liegt. Trotz der Mutation Ala26Pro gelangt ausreichend Vitamin K für die Reduktion in das aktive Zentrum und es wird genügend Substrat für die GGCX bereitgestellt, da FIX-Aktivität messbar ist (52% FIX-Aktivität bei $1 \mu\text{M}$ Warfarin; Abb. 3.14).

Der Austausch zu Threonin an derselben Stelle (Ala26Thr) scheint die Konformation der hVKORC1 nicht so stark zu beeinflussen, da diese Variante zu einer milden Resistenz führt (IC_{50} 73,7 nM). Threonin ist ebenso wie Alanin eine kleine Aminosäure und besitzt nur eine zusätzliche Hydroxymethyl-Gruppe ($-\text{CH}_2\text{OH}$). Die alpha-helicale Konformation der ersten TM-Domäne scheint durch diese Mutation kaum beeinflusst zu werden, so dass Warfarin scheinbar nicht vollständig an einer Bindung gehindert wird sondern sich nur die Affinität vermindert hat.

Der mildeste Resistenzgrad aller Mutationen ist bei der Variante Leu27Val gegeben. Der Aminosäureaustausch scheint die Konformation der hVKORC1 und die Affinität zum Warfarin kaum zu beeinflussen. Die beiden anderen Aminosäureaustausche (His28Gln, Val29Leu) in der ersten TM-Domäne scheinen ebenfalls keinen starken Einfluss auf die Konformation des Proteins und die Warfarin-Affinität zu haben und führen ebenfalls zu einem milden Resistenzgrad.

Zusammenfassend bekräftigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Kontaktfläche I an der Warfarinbindung beteiligt ist. Alle untersuchten Mutationen führen zu einer Warfarin-Resistenz, wobei die VKORC1-Varianten wie z.B. die Mutation Ala26Pro, die starke Konformationsänderungen hervorrufen, die stärksten Resistenzen verursachen. Der Resistenzgrad ist daher nicht nur durch die Position der Mutation bestimmt, sondern auch durch die Art des Aminosäureaustausches.

4.3.2 VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche II

4.3.2.1 VKORC1-Mutationen, die die Kontaktfläche II direkt betreffen

Die zweite Kontaktfläche (Ser52 - Phe55) umfasst bis auf eine Aminosäure die kleine 3_{10} -Helix im ER-luminalen Loop der hVKORC1. Diese Region ist in allen Spezies vertreten, hoch konserviert und scheint ein funktionell wichtiges Element in der VKORC1 darzustellen. In der bakteriellen VKOR (*Synechococcus sp.*) ist die Helix (=1/2-Helix) des periplasmatischen Loops amphipatisch und liegt als „Deckel“ oberhalb der TM-Helices auf der ER-Membran. Die humane 3_{10} -Helix besitzt zwei Serine, wovon Ser57 eine hoch konservierte Aminosäure darstellt. Serine haben die Eigenschaft, dass sie klein sind und oft in engen Helices auf Proteinoberflächen vorkommen. Während des Elektronentransfers und der Reduktion von Vitamin K muss die serinreiche Helix in räumliche Nähe zum aktiven Zentrum (CXXC-Motiv) gelangen, damit die Elektronen auf das CXXC-Motiv übertragen werden können. Dafür ist eine Konformationsänderung notwendig, die auch von großer Wichtigkeit für die VKORC1-Aktivität ist.^[16]

In der Kontaktfläche II, die nur vier Aminosäuren in der hVKORC1 umfasst, sind drei Mutationen bekannt, die zu einem mittleren Resistenz-Phänotyp führen (Ser52Leu, Ser52Trp, Val54Leu). Die IC_{50} der Mutationen Ser52Leu und Ser52Trp (182,2 nM, 139,5 nM) sind leicht höher als die der Mutation Val54Leu in der 3_{10} -Helix (111,8 nM). Die Hydroxyl-Gruppe des Serins ist reaktiv und in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Substraten zu bilden. Daher bilden möglicherweise die Serine der 3_{10} -Helix auch Wasserstoffbrückenbindungen mit Warfarin aus, so dass der

Aminosäureaustausch eines der Serine zu einer geringeren Warfarin-Affinität führen könnte.

Die beiden Aminosäuren Valin und Leucin sind sich strukturell ähnlich und besitzen beide unpolare/hydrophobe Eigenschaften. Allerdings besitzt Leucin ein zusätzliches Kohlenstoffatom in der Seitenkette und ist größer als Valin. Daher könnte beim Aminosäureaustausch Val54Leu eine leichte Strukturveränderung der 3_{10} -Helix den mittleren Resistenzgrad bedingen.

4.3.2.2 VKORC1-Mutationen, die die Kontaktfläche II indirekt beeinflussen

Es sind acht weitere Mutationen bekannt, die in direkter Nähe zur Kontaktfläche II lokalisiert sind und diese beeinflussen (Asp36Gly, Asp36Tyr, Val45Ala, Ser56Phe, Arg58Gly, Trp59Arg, Trp59Cys, Trp59Leu). Diese Mutationen liegen im C- oder N-Terminus des ER-luminalen Loops der hVKORC1.

Evolutionär betrachtet ist die Aminosäure Trp59 hoch konserviert. Interessanterweise sind in der humanen VKORC1 an dieser Stelle häufig Mutationen zu beobachten, die zu einer Warfarinresistenz führen. In der hVKORC1 sind Aminosäureaustausche zu Leucin, Arginin und Cystein bekannt. Die Aminosäure Trp59 soll die Funktion eines „Ankers“ besitzen, die wahrscheinlich die Bewegung der 3_{10} -Helix des Loops reguliert.^[16] Mutationen des „Ankers“ könnten bewirken, dass die 3_{10} -Helix in ihrem natürlichen Bewegungsablauf und ihrer Funktion gestört ist, der natürliche Elektronentransfer aber trotzdem intakt bleibt (Abb 4.3A). In unserem Modell der hVKORC1 scheint Trp59 eher die Funktion eines „Scharniers“ zu haben, das reguliert, dass die Loop-Cysteine in räumlicher Nähe zum CXXC-Motiv gelangen und somit der Elektronentransfer ermöglicht wird (Abb 4.3B). Des Weiteren geht Trp59 in unserem hVKORC1-Modell Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr119 in TM3 und Gln78 sowie Asn80 in TM2 ein. Zusätzlich bestehen hydrophobe Interaktionen zwischen Trp59 - Leu128, -Val127 und -Ile123.

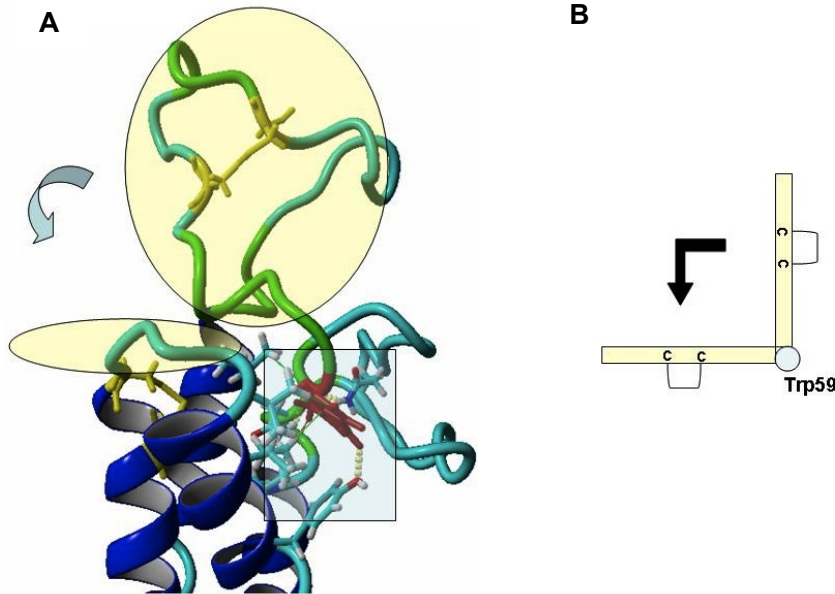


Abb. 4.3: Funktion der Aminosäure Trp59 als „Anker“.

In beiden Abbildungen ist mit Hilfe des Modells der hVKORC1 dargestellt, wie die Aminosäure Trp59 mit „Scharnier“-Funktion die Bewegung des ER-luminalen Loops beeinflusst.

A: In dem ausgewählten Abschnitt des hVKORC1-Modells ist Trp59 in rot dargestellt. Die vom Trp59 ausgehenden Wasserstoffbrückenbindungen sind gelb gepunktet, hydrophobe Interaktionen sind die grünen Linien. Der Pfeil zeigt die Bewegung der „Deckel“-ähnlichen ER-luminalen Struktur (siehe oberen gelben Kreis) zum CXXC-Motiv (gelber Kreis in der Transversalebene) an.

B: Schematische Darstellung der „Scharnier“-Funktion des Trp59 wie in Abb.4.3A gezeigt.

Im zellbasierten Assay zeigt die hVKORC1-Variante Trp59Leu den stärksten Resistenzphänotyp der drei Mutationen und besitzt mit einer IC_{50} von 1857,9 nM die höchst benötigte Konzentration an Warfarin aller untersuchter Mutationen für eine 50%ige Inhibierung der hVKORC1. Es ist ein Patient mit dieser Mutation bekannt, der mit der 5-fach üblichen Menge an Phenprocoumon nicht therapeutisch antikoagulierbar war. Anhand unserer Ergebnisse führt diese Mutation zu einer kompletten Resistenz und Patienten mit dieser Mutation können höchst wahrscheinlich nicht mit Cumarinen antikoaguliert werden. Im Vergleich zum wt benötigt diese Mutation die 75-fache Menge an Warfarin für eine IC_{50} .

Die Mutation Trp59Arg besitzt einen ebenfalls starken Resistenz-Phänotyp mit einer IC_{50} von 433,0 nM und benötigt somit im Vergleich zum wt für eine halbmaximale Inhibition eine 17-fach höhere Konzentration an Warfarin. Auch hier ist nur ein Patient mit dieser Mutation bekannt, der mit einer 7-fach höheren Dosis an Phenprocoumon stabil antikoaguliert werden konnte. Hier wird deutlich, dass die Daten aus unserem Assay, insbesondere für die kompletten Resistenzen, nur als

Richtwerte für den Resistenzgrad genommen werden können und die Dosierung trotzdem stark vom jeweiligen Patienten abhängig ist. Jedoch zeigen die Patientendaten und die Ergebnisse der neuen Methode deutlich, dass der Aminosäureaustausch Trp59Arg einen starken Resistenzphänotyp verursacht. Im Gegensatz dazu konnte im VKOR-DTT Assay für diese Mutation keine Aktivität und somit auch keine Resistenz gezeigt werden.^[55]

Die VKORC1-Variante Trp59Cys zeigt den geringsten Resistenzphänotyp der drei an dieser Stelle bekannten Mutationen. In dem neuen Assay besitzt diese Mutation eine IC_{50} von 187,6 nM (7,6-fache vom wt). Es ist ein Patient mit dieser Mutation beschrieben, der mir der 3,5 fachen Menge an Phenprocoumon keine therapeutische INR erreichen konnte. Die aus unserem Assay ermittelten Daten weisen darauf hin, dass dieser Patient möglicherweise mit einer wesentlich höheren Cumarindosis hätte stabil anticoaguliert werden können.

Unterstützend zu den Patientendaten zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass Trp59 eine wichtige Funktion in der Warfarinbindung hat. Die Aminosäureaustausche an dieser Stelle scheinen die 3_{10} -Helix und eventuell andere Strukturen der hVKORC1 so stark zu beeinflussen, dass Warfarin nicht mehr ausreichend binden kann. Möglicherweise interagiert Warfarin mit Trp59 im wt Protein und behindert die Bewegung der 3_{10} -Helix während des Elektronentransfers. Diese Hypothese wird durch die starken Resistenzen, die die Mutationen an der Stelle Trp59 verursachen, gestützt. Die 3_{10} -Helix scheint allerdings trotz der Aminosäureaustausche intakt zu sein und Mutationen scheinen die VKORC1-Aktivität nicht zu beeinträchtigen.

Auch die restlichen Mutationen, die sich in räumlicher Nähe zur Kontaktfläche II befinden (Asp36Gly, Asp36Tyr, Val45Ala, Ser56Phe, Arg58Gly), zeigen einen mittleren Resistenzphänotyp, der mit dem Patientenphänotyp übereinstimmt (IC_{50} : 78,1 nM, 92,8 nM, 152 nM, 166,8 nM, 85 nM).

Die Mutation Arg58Gly befindet sich wie die Aminosäure Trp59 am Ende der serinreichen 3_{10} -Helix. Im Gegensatz zu den drei Mutationen in Trp59 führt die VKORC1-Variante Arg58Gly jedoch zu einer milden Warfarinresistenz. In unserem

hVKORC1-Modell interagiert Arg58 allerdings nicht wie Trp59 mit benachbarten Aminosäuren und bewirkt dementsprechend nur eine kleine Konformationsänderung.

Die hVKORC1-Mutation Ser56Phe ist in der serinreichen 3_{10} -Helix lokalisiert, die wie zuvor beschrieben eine wichtige Funktion in der VKORC1 einzunehmen scheint. Phenylalanin besitzt eine hydrophobe Seitenkette und ist größer als Serin. Daher könnte der Aminosäureaustausch dazu führen, dass sich die Konformation des Proteins ändert und polare Interaktionen mit Warfarin nicht mehr möglich sind. Dies könnte zu dem moderaten Resistenzphänotyp mit einer IC_{50} von 166,8 nM führen.

Die hVKORC1-Varianten Asp36Gly, Asp36Tyr und Val45Ala befinden sich im C-Terminus des ER-luminalen Loops. Auch hier werden die milden bis moderaten Warfarinresistenzen wahrscheinlich durch Änderungen der Konformation des Loops sowie der Polarität verursacht. Durch die Aminosäureaustausche können auch möglichen Interaktionen mit benachbarten Aminosäuren unterbunden werden.

Zusammengefasst führen alle untersuchten Mutationen, die direkt in oder in räumlicher Nähe zur Kontaktfläche II lokalisiert sind, zu einer Cumarinresistenz. Es sind milde bis komplette Resistenzphänotypen vertreten, wobei sich die kompletten Resistenzen auf Mutationen in der Aminosäure Trp59 beschränken. Daher scheint der „Anker“ Trp59 eine besondere Funktion in der hVKORC1 und der Warfarinbindung zu haben. Auch die serinreiche 3_{10} -Helix scheint eine wichtige Rolle in der Cumarininhibition zu spielen. Zudem befindet sich die Kontaktfläche II in räumlicher Nähe zu den Cysteinen Cys43 und Cys51 im N-Terminus des Loops, welche für den Elektronentransfer von Bedeutung sind. Die Interaktion von Warfarin mit der Kontaktfläche II behindert daher wahrscheinlich den inter- oder intramolekularen Elektronentransfer, indem entweder der Zugang der PDI's zum Loop oder die Elektronenübertragung auf das CXXC-Motiv gestört wird.

4.3.3 VKORC1-Mutationen in Warfarin-Kontaktfläche III

Die dritte Kontaktfläche betrifft die Aminosäuren Phe131-Thr137. Hier sind drei Mutationen bekannt, die diese Kontaktfläche beeinflussen (Ile123Asn, Leu128Arg, Tyr139His). Die Mutation Tyr139His wird in Abschnitt 4.2.2 diskutiert.

Die Mutation Leu128Arg ist zwischen der dritten und vierten TM-Domäne lokalisiert und bedingt einen kompletten Resistenzphänotyp mit einer IC_{50} von 1226,4 nM. Da Arginin größer ist als Leucin, führt der Aminosäureaustausch wahrscheinlich zu einer entscheidenden Konformationsänderung zwischen der dritten und vierten TM-Domäne. Demnach scheint die Mutation Leu128Arg wie die Ala26Pro-Variante Warfarin sterisch an einer Bindung zu hindern. Warfarin scheint nicht mehr mit der Kontaktfläche III interagieren zu können, was in einem hohen Resistenzgrad resultiert.

Die Mutation Ile123Asn führt mit einer IC_{50} von 209,0 nM zu einer mittleren Resistenz. Hier ist ein Patient beschrieben, der mit der 7-fachen Menge an Phenprocoumon keine therapeutische INR erreichen konnte. Die ermittelte IC_{50} für Ile123Asn ist im Vergleich zur wt hVKORC1 um ein 8,5-faches höher. Der Patient hätte eventuell mit der 8- oder 9-fachen Menge an Phenprocoumon therapeutisch antikoaguliert werden können.

Die Aminosäuren Leu128 und Ile123 gehen im wt Protein mit dem sogenannten „Anker“ Trp59 hydrophobe Interaktionen ein. Da Trp59 eine wichtige Funktion in der Warfarinbindung besitzt und diese Interaktion wahrscheinlich durch die Aminosäureaustausche Leu128Arg und Ile123Asn gestört ist, könnte dies der Grund für die hohen Resistenzgrade beider Mutationen sein.

Zusammengefasst beinhaltet die dritte Kontaktfläche nur einen kleinen Teil der hVKORC1. Trotzdem haben die drei bekannten Mutationen, die die Kontaktfläche III beeinflussen, einen erheblichen Effekt auf die Warfarinbindung, insbesondere wenn der Aminosäureaustausch wie bei Leu128Arg zu einer großen Konformationsänderung führt. Ebenfalls fällt auf, dass die Kontaktfläche III das aktive

Zentrum (Cys132 und Cys134) beinhaltet. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Warfarin wahrscheinlich den Elektronentransfer zum aktiven Zentrum blockiert und/oder die Vitamin K-Bindung verhindert.

4.3.4 VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden können

Fünf weitere Mutationen können auf Grund ihrer Lokalisation keiner bestimmten Kontaktfläche zugeordnet werden. Diese Mutationen befinden sich alle im C-Terminus des ER-luminalen Loops der hVKORC1 (Val66Gly, Val66Met, Gly71Ala, Asn77Ser, Asn77Tyr). Trotz das diese Mutationen keiner bestimmten Kontaktfläche zugeordnet werden können besitzen sie in unserem Assay milde bis moderate Resistenzen, die zudem mit den Patientenphänotypen übereinstimmen. Im VKOR-DTT Assay weisen alle diese Mutationen keine VKOR-Aktivität auf.^[55]

Der Aminosäureaustausch Val66Gly besitzt eine IC_{50} von 68,9 nM. Dies entspricht im Vergleich zur wt hVKORC1 der 2,8-fachen Menge an Warfarin für eine halbmaximale Inhibition. Es ist nur ein Patient bekannt, der diese Mutation trägt und mit der 2,5-fachen Menge an Phenprocoumon erfolgreich antikoaguliert werden konnte. Somit stimmen die Daten aus dem zellbasierten Assay sehr gut mit dem Patientenphänotyp überein.

Es sind sieben Patienten mit der Mutationen Val66Met beschrieben, die mit der durchschnittlich 3- bis 6-fachen Dosis an Warfarin stabil antikoagulierbar sind. Val66Met benötigt in der zellbasierten Methode die 5,4-fache Menge an Warfarin für eine halbmaximale Inhibition (IC_{50} von 133,6 nM) und somit liefert der Assay auch in diesem Fall einen guten Richtwert für die benötigte erhöhte Warfarin-Dosis.

Patienten mit der Mutation Gly71Ala bzw. Asn77Ser konnten mit der 2- bzw. 3-fachen Menge an Phenprocoumon keine therapeutische INR erreichen (INR 1,2 bzw. 1,6). Anhand der Ergebnisse des neuen Assays könnten diese Patienten wahrscheinlich mit der 5-fachen Coumarin-Menge stabil antikoaguliert werden (IC_{50} 126,5 nM bzw. 131 nM).

Auch die IC_{50} von 95,6 nM für Asn77Tyr stimmt mit dem Patientenphänotyp überein. Mit der 3,5-fachen Menge an Warfarin konnte ein Patient mit dieser Mutation stabil antikoaguliert werden. Die errechnete IC_{50} von Asn77Tyr beträgt das 3,9-fache der wt IC_{50} .

Die Ergebnisse, die im neuen zellbasierten Assay für die Mutationen Val66Gly, Val66Met, Gly71Ala, Asn77Ser und Asn77Tyr generiert wurden, stimmen sehr gut mit den Patientenphänotypen überein. Da diese Mutationen keiner Kontaktfläche zugeordnet werden konnten, jedoch zu moderaten Resistenzen führen, scheinen diese Mutationen einen indirekten Einfluss auf die Interaktion zwischen Warfarin und der hVKORC1 zu haben.

Abschließend kann festgestellt werden, dass das Modell der hVKORC1 und die darin simulierte Warfarinbindung durch den Vergleich der Daten aus dem neuen Assay mit dem jeweiligen Patientenphänotyp gestützt wird. Daher scheint das Modell der drei Kontaktflächen, die in die Warfarinbindung involviert sein sollen, sehr realitätsnah zu sein. Anhand der IC_{50} -Werte scheint die Kontaktfläche I insgesamt gesehen den geringsten Einfluss im Vergleich zu den Kontaktflächen II und III auf die Warfarinbindung zu haben. Mutationen, die große Konformationsänderungen bewirken oder wichtige Strukturen in der hVKORC1 betreffen, bewirken die stärksten Resistenzen. So konnte gezeigt werden, dass die 3_{10} -Helix und die Aminosäure Trp59 eine sehr wichtige Funktion in der hVKORC1 besitzen. Wahrscheinlich regulieren diese Strukturen den intramolekularen Elektronentransfer. Auch konnte bestätigt werden, dass das TYA-Motiv eine Rolle in der Warfarinbindung einnimmt, die allerdings möglicherweise überschätzt wird.

4.4 Der Bypass des Vitamin K-Zyklus

Mehrere verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass es einen Bypassmechanismus zum Vitamin K-Zyklus gibt, in dem mindestens ein weiteres Enzym die VKORC1-Funktion als Chinonreduktase übernehmen kann.

Bei einer Cumarin-Überdosierung lassen sich die Patienten mit 1-5 mg Vitamin K pro Tag antagonisieren, falls sie keine oder nur geringe Blutungserscheinungen zeigen.^[79] Die Thromboplastinzeit ist bei diesen Patienten bereits innerhalb weniger Stunden verringert. Bei lebensbedrohlichen Blutungen wird zusätzlich zu 10-20 mg Vitamin K Prothrombinkomplex-Konzentrat verabreicht.^[79] Der Mechanismus der Warfarin-Antagonisierung mit Vitamin K ist zur Zeit noch nicht geklärt. Es könnte sich hier um einen kompetitiven Mechanismus zwischen Warfarin und Vitamin K handeln. Ebenso könnte auch ein Bypassenzym für diesen Effekt verantwortlich sein, welches nur bei hohen Dosen an Vitamin K die Vitamin K-Reduktion katalysiert.

Ein weiterer Hinweis sind *VKORC1* Knockout-Mäuse (K.O.-Mäuse). An ihnen konnte gezeigt werden, dass die *VKORC1* für eine funktionierende Gerinnung und andere physiologische Prozesse essentiell ist. *VKORC1* K.O.-Mäuse sterben innerhalb einiger Tage häufig an intracraniellen Blutungen. Durch hohe Dosen an Vitamin K (30-50 µg/Tag) erreichen die K.O.-Mäuse jedoch Aktivitäten an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren um 20%, zeigen keine Blutungen und überleben solange sie mit Vitamin K substituiert werden. Nach Absetzen des Vitamin K versterben die Mäuse spätestens nach acht Tagen.^[80] Der Mechanismus, der hinter dem leichten Anstieg der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine FII, FVII, FIX, FX steht, wobei FX die höchste Aktivität erreicht, ist jedoch nicht bekannt. Diese Beobachtung spricht für die Existenz eines Bypassenzyms, welches unter sehr hohen Vitamin K-Dosen die Reduktion von Vitamin K zu Vitamin K-Hydrochinon katalysiert.

4.4.1 Mögliche Bypassenzyme des Vitamin K-Zyklus

Ein Kandidatenenzym für den Bypassmechanismus des Vitamin K-Zyklus ist die NQO1. Es ist bekannt, dass die NQO1 die 2 Elektronen Reduktion des synthetischen Menadions (Vitamin K3) katalysiert und somit oxidativen Stress reduziert.^[81] Des Weiteren sollen Mikrosomen ohne NQO1 eine geringere Carboxylierungsaktivität besitzen.^[82] Dieses Ergebnis widerspricht den Beobachtungen einer anderen Forschergruppe, die zeigen konnte, dass NQO1 nicht die Vitamin K-Reduktion während der γ -Carboxylierung von VKD-Proteinen katalysiert.^[83] Die neuesten Untersuchungen mit HEK293- und AV12-Zellen lassen ebenfalls vermuten, dass die NQO1 nicht das Bypassenzym des Vitamin K-Zyklus ist.^[84] Auch unsere Arbeitsgruppe konnte bei einer Untersuchung von 28 verschiedenen Mausgeweben zeigen, dass die mRNA-Expression der *NQO1* in der Leber sehr gering ist.^[85] Da die Synthese der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren in der Leber stattfindet, ist es daher unwahrscheinlich, dass die NQO1 das Bypassenzym des Vitamin K-Zyklus darstellt.

Das zweite Kandidatenenzym für den möglichen Bypass des Vitamin K-Zyklus ist das Isoenzym der VKORC1, die VKORC1L1. Sie ist wie die VKORC1 in der ER-Membran lokalisiert, *in vitro* mittels des VKOR-DTT Assays in der Lage Vitamin K-Chinon zu reduzieren und zudem weniger warfarinsensitiv als die VKORC1.^[28] Da jedoch die VKORC1L1 eine zentrale Funktion in der zellulären Antioxidation besitzt und Defekte in der *VKORC1* nicht kompensieren kann, geht man derzeit davon aus, dass die VKORC1L1 unter physiologischen Bedingungen keine Rolle im klassischen Vitamin K-Zyklus spielt.^[28]

Zur Klärung ob NQO1 und/oder die VKORC1L1 eine Funktion als Bypassenzym im Vitamin K-Zyklus besitzen, wurden bicistronische Vektoren hergestellt, in denen wie bei den Messungen der Coumarinresistenzen die FIX-Aktivität als physiologischer Marker dienen sollte. Die Idee war, dass falls NQO1 und/oder VKORC1L1 in der Lage sein sollte Vitamin K zu reduzieren, FIX-Aktivität wie bei der Kofunktion mit der VKORC1 messbar sein müsste. Dafür wurde in den bicistronischen Vektor die cDNA der *NQO1* und der *VKORC1L1* zusammen mit der *F9* cDNA kloniert und diese in HEK293T-Zellen untersucht. Da die endogene VKORC1-Aktivität der HEK293T-

Zellen die Ergebnisse beeinflussen könnte und alle Säugetierzellen endogen VKOR-Aktivität besitzen, wurde das System auch auf Insektenzellen mittels Baculovirusinfektion übertragen. Da sich das Insekten-Gerinnungssystem von dem der Vertebraten unterscheidet, bestand die Hoffnung, dass die Insektenzellen keine VKOR-Aktivität besitzen, die den humanen FIX aktiviert.^[86]

4.4.2 NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme in HEK-Zellen

Bei den Untersuchungen in HEK293T-Zellen diente die FIX-Aktivität mit *VKORC1* cDNA kotransfizierter Zellen als Positivkontrolle und Referenz. Die Zellen werden demselben Stress wie bei den anderen Konstrukten ausgesetzt, da sie zwei Proteine synthetisieren müssen. Zusätzlich war auf Grund der vorhergegangenen Experimente bekannt, dass das System unter diesen Bedingungen stabil arbeitet und die transfizierte sowie die endogene *VKORC1* bei der Zugabe von 1 μ M Warfarin komplett inhibiert wird.

Bei den Ansätzen, die nur mit Vitamin K₁ inkubiert wurden, besitzen die Zellen die mit *VKORC1L1* kotransfiziert wurden, im Vergleich zu *VKORC1* kotransfizierten Zellen 103% FIX-Aktivität und die mit *NQO1* kotransfizierten Zellen eine FIX-Aktivität von nur 70% (Abb. 3.23). Bei diesem Experiment wurde in jedem Ansatz FIX-Aktivität erwartet, da die endogene VKOR-Aktivität der HEK-Zellen für eine Aktivierung des koexprimierten FIX ausreichend ist. Da jedoch die endogene VKOR-Aktivität konstant ist, können die jeweils resultierenden FIX-Aktivitäten der verschiedenen Ansätze untereinander verglichen werden. Die FIX-Aktivität bei den mit *VKORC1* kotransfizierten Zellen kann als Maximal- bzw. Richtwert angesehen werden. Da die FIX-Aktivität in den Zellen, die mit *VKORC1L1* cDNA kotransfiziert wurden, vergleichbar hoch wie bei den mit *VKORC1* cDNA kotransfizierten Zellen ist, kann die *VKORC1L1* vermutlich entgegen der bisherigen Vermutung der GGCX Substrat in Form von Vitamin K-Hydrochinon bereitstellen. Da die FIX-Aktivität bei den mit *NQO1* cDNA kotransfizierten Zellen wesentlich niedriger ist, scheint die *NQO1* unter den hier gewählten Bedingungen keine Rolle im klassischen Vitamin K-Zyklus zu spielen. Die gemessene FIX-Aktivität in diesem Ansatz ist wahrscheinlich nur der endogenen VKOR-Aktivität der HEK293T-Zellen zuzuschreiben.

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen die transfizierten Zellen mit 1 μM Warfarin und 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Vitamin K_1 inkubiert wurden. In diesen Ansätzen wird eine Warfarinvergiftung simuliert, da die endogene sowie kotransfizierte *VKORC1* komplett inhibiert wird (Abb. 3.23). Daher sieht man wie erwartet keine FIX-Aktivität bei den Zellen, die mit *VKORC1* cDNA kotransfiziert wurden. Bei den mit *NQO1* cDNA kotransfizierten Zellen ist ebenfalls keine FIX-Aktivität messbar. Es könnte sein, dass die Menge an Vitamin K_1 in diesem Versuchsansatz unzureichend ist, um die *NQO1* zur Reduktion von Vitamin K-Chinon zu zwingen, da die *NQO1* nur bei hohen Vitamin K-Dosen als Bypassenzym agieren soll. Erstaunlicherweise ist bei den Zellen, die mit *VKORC1L1* cDNA kotransfiziert wurden, FIX-Aktivität im Überstand messbar (33%, Abb.3.23).

Wird nun die Antagonisierung einer Warfarinvergiftung mit Vitamin K simuliert, indem die Zellen mit 1 μM Warfarin und der 10-fachen Menge an Vitamin K_1 (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$) inkubiert werden, so ist in allen Ansätzen wieder FIX-Aktivität messbar. Erstaunlicherweise scheint die Warfarininhibition durch die höhere Vitamin K_1 -Konzentration aufgehoben oder kompensiert zu werden. Entweder liegt hier wie bereits in Abschnitt 4.2.3 vermutet ein kompetitiver Mechanismus der endogenen *VKORC1* vor und/oder ein anderes unbekanntes, endogenes Enzym der HEK293T-Zellen katalysiert die Reduktion von Vitamin K_1 , allerdings nur bei sehr hohen Vitamin K_1 -Dosen. Mit *VKORC1L1* kotransfizierte Zellen besitzen auch in diesem Ansatz die höchste FIX-Aktivität (67%). Dies spricht dafür, dass die *VKORC1L1* der *GGCX* Vitamin K-Hydrochinon bereitstellen kann. Die wie beim Ausgangsexperiment geringere FIX-Aktivität bei mit *NQO1* cDNA kotransfizierten Zellen lässt weiterhin vermuten, dass die *NQO1* keine Funktion als Bypassenzym im Vitamin K-Zyklus hat. Für die FIX-Aktivität muss ein anderes endogenes Enzym verantwortlich sein. Ob es sich dabei um die *VKORC1*, *VKORC1L1* oder ein anderes unbekanntes Enzym handelt, kann anhand der Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen die Experimente in den HEK293T-Zellen, dass *NQO1* wahrscheinlich nicht die Reduktion von Vitamin K als Bypassmechanismus des Vitamin K-Zyklus katalysiert - weder bei Vitamin K-Konzentrationen im Normbereich noch bei unphysiologisch hohen Vitamin K-Mengen. Allerdings scheint unerwarteterweise die *VKORC1L1* eine Funktion im klassischen Vitamin K-Zyklus zu

besitzen und der GGCX Vitamin K-Hydrochinon bereitstellen zu können. Auch bei Warfarin-Konzentrationen, bei denen die VKORC1 üblicherweise inhibiert wird, kann die VKORC1L1 das Substrat reduzieren. Dies bestätigt zusätzlich die Ergebnisse aus dem VKOR-DTT Assay, dass die VKORC1L1 weniger warfarinsensitiv ist als die VKORC1.^[28] Jedoch muss beachtet werden, dass unser System zwar *in vivo* in Zellen gemessen wird, trotzdem wegen der Überexpression der zu untersuchenden Proteine artifiziell ist. Dadurch wird z.B. die VKORC1L1 in wesentlich höheren Konzentrationen in der ER-Membran exprimiert als im natürlichen Zustand. Im Organismus sind die VKORC1 und die GGCX wahrscheinlich zusammen als Komplex oder in sogenannten „lipid rafts“ in der ER-Membran als funktionelle Einheiten organisiert. Die VKORC1L1 scheint aufgrund ihrer Funktion hingegen ubiquitär in der ER-Membran verteilt zu sein, so dass sie nur dann eine Rolle im klassischen Vitamin K-Zyklus übernehmen kann, wenn sie zufällig in räumlicher Nähe zur GGCX lokalisiert ist und/oder ein deutliches Überangebot an Vitamin K vorherrscht. Diese Hypothese der räumlichen Enzymverteilung würde erklären, warum die VKORC1L1 trotz ihrer Funktion in der zellulären Antioxidation eine Rolle im klassischen Vitamin K-Zyklus spielen kann.^[28]

Ebenfalls ließe sich mit dieser Hypothese erklären, warum *VKORC1* K.O.-Mäuse trotz einer täglichen Vitamin K-Substitution Spiegel an aktivierten VKD-Gerinnungsfaktoren erreichen, die zwar für ein Überleben ausreichend sind aber den *VKORC1*-Defekt nicht ausreichend kompensieren können. Durch den massiven Überschuss an Vitamin K wird vermutlich so viel Vitamin K-Hydrochinon durch die VKORC1L1 bereitgestellt, dass durch Diffusion in der ER-Membran auch die GGCX einen kleinen Teil des VKH₂ zur Aktivierung von VKD-Proteinen nutzen kann.

4.4.3 NQO1 und VKORC1L1 als Bypassenzyme in Insektenzellen

Da alle Säugetierzellen endogene Aktivität von Enzymen aufweisen, die am Vitamin K-Zyklus beteiligt sind, wurde die neue zellbasierte Methode mittels Baculoviren auf ein Insektenzellsystem übertragen. Insektenzellen eignen sich sehr gut zur Produktion humaner rekombinanter Proteine. Der Vorteil neben der hohen Proteinausbeute ist, dass sie fast alle posttranslationalen Modifikationen durchführen und die exprimierten Proteine den humanen Proteinen sehr ähnlich sind.

Um den kompletten Vitamin K-Zyklus in Insektenzellen zu simulieren, wurden Baculoviren hergestellt, die GGCX zusammen mit FIX exprimieren und weitere, die allein VKORC1, VKORC1L1 oder NQO1 exprimieren.

Das Sf9-Zellsystem ist wie das HEK293T-Zellsystem Vitamin K abhängig. Ohne Zugabe von Vitamin K ist kein aktivierter FIX im Überstand messbar. Allerdings besitzen auch die Insektenzellen endogen ein Enzym, welches Vitamin K-Hydrochinon für die humane GGCX zur Aktivierung des humanen FIX bereitstellen kann. Dies geht eindeutig aus dem Infektionsansatz hervor, in dem GGCX und FIX allein in den Insektenzellen exprimiert werden (10% FIX-Aktivität, Abb. 3.25). Die endogene VKOR-Aktivität der Insektenzellen stört jedoch das Testsystem nicht, da Zellen, die zusätzlich mit VKORC1 infiziert wurden, eine deutlich höhere FIX-Aktivität besitzen (16,5% FIX-Aktivität, Abb. 3.25). Daher eignet sich diese Methode im Vergleich zum HEK293T-Zellsystem besser zur Untersuchung des Bypassmechanismus.

Zellen, die zusätzlich mit NQO1 koinfiziert wurden, zeigen eine vergleichbare FIX-Aktivität wie die Zellen, die nur mit GGCX und FIX infiziert wurden (siehe rote Linie in Abb. 3.25). Auf Grund der vergleichbaren FIX-Aktivität kann man davon ausgehen, dass in beiden Ansätzen die endogene Enzymaktivität für den aktiven FIX verantwortlich ist. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den HEK293T-Zellen und weist zusätzlich darauf hin, dass NQO1 nicht für den Bypass des Vitamin K-Zyklus verantwortlich ist (siehe Abschnitt 4.2.1). NQO1 ist zwar *in vitro* in der Lage Vitamin K zu reduzieren, aber anhand der Ergebnisse beider zellulärer Systeme stellt die NQO1 *in vivo* kein Substrat für die GGCX bereit.

Die FIX-Aktivität der mit VKORC1L1 koinfizierten Zellen ist höher als die der nur mit GGCX und FIX infizierten Zellen (Abb. 3.25). Demnach scheint die VKORC1L1 auch im Insektenzellsystem Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon zu reduzieren und der GGCX als Substrat bereit zu stellen. Die FIX-Aktivität ist nicht so hoch wie bei den mit VKORC1 koinfizierten Zellen, dennoch werden die Ergebnisse aus den HEK293T-Zellen (siehe Abschnitt 4.4.2) zusätzlich bestätigt. Somit ist auf zwei Wegen nachgewiesen worden, dass die VKORC1L1 eine Funktion im klassischen Vitamin K-Zyklus hat – wenn sie überexprimiert wird.

5 Fazit und Ausblick

Ziel der Dissertation war es eine neue Methode zur Untersuchung der VKORC1 zu etablieren, deren Ergebnisse die VKORC1-Funktion besser widerspiegeln als der bisher allgemein verwendete VKOR-DTT Assay.

Mit der neu entwickelten Methode können jetzt zum ersten Mal cumarinresistente *VKORC1*-Mutationen funktionell untersucht und standardisierte Daten für alle Mutationen generiert werden, die es erlauben, die jeweiligen VKORC1-Varianten in bestimmte Resistenzgrade einzuteilen. Diese Daten können auch mit in die Cumarintherapie einbezogen werden und zur Optimierung einer patientenindividuellen Dosierung beitragen.

Zusätzlich konnte mit dem neuen Assay aufgezeigt werden, welche Aminosäuren und Strukturen in der hVKORC1 besonders in die Warfarinbindung involviert sind. Auch konnten neue Hypothesen bezüglich der generellen Cumarinbindung und des Bypassmechanismus des Vitamin K-Zyklus aufgestellt werden. Dadurch haben sich mit dieser Arbeit weitere wichtige Fragestellungen entwickelt:

- Bindet Warfarin wirklich irreversibel an die VKORC1 oder handelt es sich eher um einen kompetitiven Mechanismus?
- Wo bindet Vitamin K an die VKORC1?
- Ist VKORC1L1 das gesuchte Bypassenzym des Vitamin K-Zyklus oder gibt es ein weiteres unbekanntes Enzym, welches Vitamin K-Chinon reduzieren kann?

Da der neue Assay dahingehend limitiert ist, dass die endogene VKOR-Aktivität der Zellen ausreicht, um aktivierten FIX zu messen, wären weiterführende Projekte denkbar, in denen eine *VKORC1* Knockout-Zelllinie generiert wird, um die neu entstandenen Fragestellungen zu bearbeiten. Damit könnten gezielt VKORC1-Varianten untersucht werden, die eine VKOR-Aktivitätsminderung bewirken. Auch könnte diese Zelllinie dazu genutzt werden, um die Vitamin K-Bindungsstelle zu identifizieren. Weitere Knockout-Zelllinien in denen die *NQO1* und die *VKORC1L1* ausgeschaltet sind, könnten den Bypassmechanismus des Vitamin K-Zyklus endgültig aufklären.

Literaturverzeichnis

1. Stahmann MA, Huebner CF, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent. *J. Biol. Chem.* 1941; 138:513
2. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004 Feb 5;427(6974):537-41.
3. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2004 Feb 5;427(6974):541-4.
4. Keréveur A, Leclercq M, Trossaërt M, Dupeyron JP, Parent F, Horellou MH, Conard J, Bachmann F, Samama MM. Vitamin K metabolism in a patient resistant to vitamin K antagonists. *Haemostasis.* 1997 Jul-Aug;27(4):168-73.
5. Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. Occurrence and chemical nature. *Nature* 1935;135, 652.
6. Lehmann J. Vitamin K as a prophylactic in 13.000 infants. *The Lancet* 1944;243, 493-494.
7. Waddell WW and Guerry D. The role of vitamin K in the prevention and treatment of hemorrhage in the newborn infant. Part I. *J.Ped.* 1939;15, 802-811.
8. Booth SL and Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J. Nutr.* 1998;128, 785-788.
9. Shearer MJ. Vitamin K. *The Lancet* 1995;345, 229-234.

10. Matschiner JT, Bell RG, Amelotti JM, and Knauer TE. Isolation and characterization of a new metabolite of phylloquinone in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1970;201, 309-315.
11. Bell RG and Matschiner JT. Vitamin K activity of phyllochinone oxide. *Arch Biochem Biophys* 1970;141, 473-476.
12. Bell RG and Matschiner JT. Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. *Nature* 1972;237, 32-33.
13. Oldenburg J, Bevans CG, Müller CR, Watzka M. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Mar-Apr;8(3-4):347-53.
14. Oldenburg J, von Brederlow B, Fregin A, Rost S, Wolz W, Eberl W, Eber S, Lenz E, Schwaab R, Brackmann HH, Effenberger W, Harbrecht U, Schurgers LJ, Vermeer C, Müller CR. Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thromb Haemost.* 2000 Dec;84(6):937-41.
15. Fregin A, Rost S, Wolz W, Kresova A, Muller CR, Oldenburg J. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood.* 2002 Nov 1;100(9):3229-32.
16. Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2010;463(7280):507-12.
17. Rost S, Fregin A, Hünerberg M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost.* 2005; 94:780-6.

18. Jin DY, Tie JK, Stafford DW. The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry*. 2007; 46(24):7279-83.
19. Ma Q, Cui K, Xiao F, Lu AY, Yang CS. Identification of a glycine-rich sequence as an NAD(P)H-binding site and tyrosine 128 as a dicumarol-binding site in rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(31):22298-304.
20. Pelz HJ, Rost S, Hünnerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicoll AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, Müller CR. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 2005;170(4):1839-47.
21. Carlisle TL, Suttie JW. Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver. *Biochemistry*. 1980 Mar 18;19(6):1161-7.
22. Stanton C, Taylor R, Wallin R. Processing of prothrombin in the secretory pathway. *Biochem J*. 1991 Jul 1;277 (Pt 1):59-65.
23. Dowd P, Hershline R, Ham SW, Naganathan S. Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Science*. 1995 Sep 22;269(5231):1684-91.
24. Vitamin K, Volume 78 (Vitamins and Hormones), Gerald Litwack; Elsevier
25. Ernster L, Ljunggren M, Danielson L. Purification and some properties of a highly dicoumarol-sensitive liver diaphorase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1960;2, 88-92.
26. Ernster L, Danielson L, Ljunggren M. DT diaphorase. I. purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 1962;58, 171-188.

27. Fasco MJ, Principe LM. R- and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *J Biol Chem.* 1982; 257(9):4894-901.
28. Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem.* 2011; 286:15085-94.
29. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2004 Dec;2(12):2118-32.
30. Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9058-62.
31. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1370-5.
32. Jorgensen MJ, Cantor AB, Furie BC, Brown CL, Shoemaker CB, Furie B. Recognition site directing vitamin K-dependent gamma-carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell.* 1987 Jan 30;48(2):185-91.
33. Stanley TB, Jin DY, Lin PJ, Stafford DW. The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):16940-4.
34. Stenflo J, Suttie JW. Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:157-72.
35. Berkner KL, Pudota BN. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 20;95(2):466-71.

36. Furie B, Furie BC. Conformation-specific antibodies as probes of the gamma-carboxyglutamic acid-rich region of bovine prothrombin. Studies of metal-induced structural changes. *J Biol Chem.* 1979 Oct 10;254(19):9766-71.
37. Nelsestuen GL. Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem.* 1976 Sep 25;251(18):5648-56.
38. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1999;9(1):59-88.
39. Sperling R, Furie BC, Blumenstein M, Keyt B, Furie B. Metal binding properties of gamma-carboxyglutamic acid. Implications for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins. *J Biol Chem.* 1978 Jun 10;253(11):3898-906.
40. Borowski M, Furie BC, Bauminger S, Furie B. Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem.* 1986 Nov 15;261(32):14969-75.
41. Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997 Mar 6;386(6620):78-81.
42. Ducky P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996 Aug 1;382(6590):448-52.
43. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Jul;71(7):2730-3.

44. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*. 1977 Feb 22;16(4):698-706.
45. Hämostaseologie, 2.Auflage 2010; Pötzsch, Madlener; Springer-Verlag
46. Stryer Biochemie, 6. Auflage 2007, Berg, Stryer, Tymoczko; Spektrum Akademischer Verlag
47. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):349-60.
48. Sofi F, Cesari F, Fedi S, Abbate R, Gensini GF. Protein Z: "light and shade" of a new thrombotic factor. *Clin Lab*. 2004;50(11-12):647-52.
49. Quick AJ. The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease is of dietary origin. A consideration of the source of prothrombin. *Am. J. Physiol*. 1937;118, 260-271.
50. Campbell HA, Roberts WL, Smith WK, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease I. The preparation of hemorrhagic concentrates. *J Biol Chem* 1940;136: 47-55.
51. Schurgers LJ, Aebert H, Vermeer C, Bültmann B, Janzen J. Oral anticoagulant treatment: friend or foe in cardiovascular disease? *Blood* 2004;104:3231-3232
52. Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Sittinger K, Spohn G, Rost S, Seifried E, Müller CR, Oldenburg J. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):109-18.

53. Friedman PA, Shia M. Some characteristics of a vitamin K-dependent carboxylating system from rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976 May 17;70(2):647-54.
54. Mack DO, Suen ET, Girardot JM, Miller JA, Delaney R, Johnson BC. Soluble enzyme system for vitamin K-dependent carboxylation. *J Biol Chem.* 1976 Jun 10;251(11):3269-76.
55. Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hammed A, Benoit E, Lattard V. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2535-43.
56. Fasco MJ, Principe LM, Walsh WA, Friedman PA. Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry* 1983;22(24); 5655-60.
57. Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem.* 2007 Jan 26;282(4):2626-35. Epub 2006 Nov 23.
58. Rishavy MA, Usubalieva A, Hallgren KW, Berkner KL. Novel Insight into the Mechanism of the Vitamin K Oxidoreductase (VKOR). *J Biol Chem.* 2011; 286; 7267-7278
59. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
60. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239(4839):487-91.

61. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989; 77(1):51-9.
62. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*. 1976; 127(3):1529-37.
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463-7.
64. Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Structural Biol*. 2010; 172; 34-44
65. Burnette WN."Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981; 112(2):195-203.
66. Fregin A* and Czogalla KJ*, Gansler J, Rost S, Taverna M, Watzka M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. A new cell culture-based assay quantifies VKORC1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the DTT-driven VKOR assay. *J Thromb Haemost*. 2013 Mar 2. doi: 10.1111/jth.12185.
67. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 1998, 19, 1639-1662.
68. Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins*. 2002 May 15;47(3):393-402.

69. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keeffe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008; 321: 956-60.
70. Busby S, Kumar A, Joseph M, Halfpap L, Insley M, Berkner K, Kurachi K, Woodbury R. Expression of active human factor IX in transfected cells. *Nature*. 1985; 316: 271-3.
71. Derian CK, VanDusen W, Przysiecki CT, Walsh PN, Berkner KL, Kaufman RJ, Friedman PA. Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems. *J Biol Chem*. 1989; 264: 6615-8.
72. Berkner KL. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII. *Methods Enzymol*. 1993; 222: 450-77.
73. Lingenfelter SE, Berkner KL. Isolation of the human gamma-carboxylase and a gamma-carboxylase-associated protein from factor IX-expressing mammalian cells. *Biochemistry*. 1996; 35: 8234-43.
74. Sun YM, Jin DY, Camire RM, Stafford DW. Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3811-5.
75. Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*. 1996; 20: 102-4, 6, 8-10.
76. Aklillu E, Leong C, Loebstein R, Halkin H, Gak E. VKORC1 Asp36Tyr warfarin resistance marker is common in Ethiopian individuals. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3903-4.

77. Myszka DG, Swenson RP. Synthesis of 3-(4-azido-5-iodosalicylamido)-4-hydroxycoumarin: photoaffinity labeling of rat liver dicoumarol-sensitive NAD(P)H: quinone reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:415-422.
78. Asher G, Dym O, Tsvetkov P, Adler J, Shaul Y. The crystal structure of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry.* 2006;45:6372-6378.
79. Pindur G, Mörsdorf S, Schenk JF, Krischek B, Heinrich W, Wenzel E. The Overdosed Patient and Bleedings with Oral Anticoagulation. *S. Thromb. Hemost.* 1999; 25; 85-8.
80. Spohn G, Kleinridders A, Wunderlich FT, Watzka M, Zaucke F, Blumbach K, Geisen C, Seifried E, Müller C, Paulsson M, Brüning JC, Oldenburg J. VKORC1 deficiency in mice causes early postnatal lethality due to severe bleeding. *Thromb Haemost.* 2009 Jun;101(6):1044-50.
81. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact.* 2000;129 ;77-97.
82. Wallin R, Gebhardt O, Prydz H. NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthaquinone)-dependent carboxylation reaction. *Biochem J.* 1978;169; 95-101.
83. Preusch PC, Smalley DM. Vitamin K1 2,3-epoxide and quinone reduction: mechanism and inhibition. *Free Radic Res Commun.* 1990; 8; 401-15.
84. Tie JK, Jin DY, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood.* 2011; 117; 2967-74.

85. Diplomarbeit Katrin Jeannette Czogalla (2009): „Quantitative Bestimmung der mRNA-Expression von Genen der am Vitamin K-Zyklus beteiligten Enzyme in der Maus“
86. Bergner A, Muta T, Iwanaga S, Beisel HG, Delotto R, Bode W. Horseshoe crab coagulogen is an invertebrate protein with a nerve growth factor-like domain. *Biol Chem.* 1997 Mar-Apr;378(3-4):283-7.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Die K-Vitamine
- Abbildung 1.2: Der Vitamin K-Zyklus
- Abbildung 1.3: Topologie der humanen VKORC1
- Abbildung 1.4: Model des Elektronentransfers
- Abbildung 1.5: Allgemeiner Strukturaufbau von VKD-Proteinen
- Abbildung 1.6: Schema der sekundären Hämostase
- Abbildung 1.7: Schema des experimentellen Ablaufs des VKOR-DTT Assay
- Abbildung 2.1: Prinzip der Mutagenese-PCR
- Abbildung 2.2: Schema zum restriktionsfreiem Klonieren (Restriction free cloning)
- Abbildung 3.1: Schema des experimentellen Verlaufs der neuen Methode zur Messung der VKORC1-Aktivität
- Abbildung 3.2: Struktur-Vergleich zwischen der humanen VKORC1 und der *Synechococcus sp.*-VKOR
- Abbildung 3.3: Struktur der humanen VKORC1 basierend auf der *Synechococcus sp.*-Kristallstruktur
- Abbildung 3.4: Mögliche Warfarin-Bindungsstellen in der humanen VKORC1
- Abbildung 3.5: Warfarin-Bindung in der humanen VKORC1
- Abbildung 3.6: Warfarin-Kontaktflächen in der humanen VKORC1
- Abbildung 3.7: Expression der VKORC1-Mutationen, die der ersten Kontaktfläche angehören
- Abbildung 3.8: Expression der VKORC1-Mutationen, die der zweiten Kontaktfläche angehören
- Abbildung 3.9: Expression der VKORC1-Mutationen, die der dritten Kontaktfläche angehören
- Abbildung 3.10: Expression der VKORC1-Mutationen, die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden konnten
- Abbildung 3.11: Expression von VKORC1-Mutationen, die mit Warfarin behandelt wurden
- Abbildung 3.12: FIX-Antigenlevel von drei exemplarischen VKORC1-Varianten
- Abbildung 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve der endogenen VKOR-Aktivität von HEK293T-Zellen

- Abbildung 3.14: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der Kontaktfläche I
- Abbildung 3.15: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der 3₁₀-Helix
- Abbildung 3.16: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen die indirekt Einfluss auf die Kontaktfläche II nehmen
- Abbildung 3.17: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen die die Aminosäure Trp59 betreffen
- Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen in der Kontaktfläche III
- Abbildung 3.19: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Varianten im TYA-Motiv
- Abbildung 3.20: Dosis-Wirkungs-Kurven von VKORC1-Mutationen die keiner Kontaktfläche zugeordnet werden können
- Abbildung 3.21: FIX-Aktivitäten von mit wt *VKORC1* und *F9* cDNA transfizierten HEK293T-Zellen unter verschiedenen Vitamin K und Warfarin Bedingungen
- Abbildung 3.22: FIX-Aktivitäten von HEK293T-Zellen die mit *F9* cDNA und *NQO1*, *VKORC1L1* oder *VKORC1* cDNA kotransfiziert wurden
- Abbildung 3.23: FIX-Aktivitäten der mit Baculoviren infizierten Sf9-Zellen
- Abbildung 3.24: FIX-Aktivität der mit *VKORC1*, *VKORC1L1* oder *NQO1* Baculoviren koinfizierten Sf9-Zellen
- Abbildung 4.1: Wasserstoffbrückenbindungen des TYA-Motivs
- Abbildung 4.2: Strukturvergleich zwischen Warfarin und Vitamin K
- Abbildung 4.3: Funktion der Aminosäure Trp59 als „Anker“

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 3.1: FIX-Aktivitäten verschiedener fetaler Rinderseren
- Tabelle 3.2: VKOR-Strukturen nach Li *et al.* und nach unserem Proteinmodell
- Tabelle 3.3: Warfarin-Kontaktflächen in der humanen VKORC1
- Tabelle 3.4: IC₅₀-Werte aller cumarinresistenter VKORC1-Varianten

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
Bidest.	Bidestillatus
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy/ complementary DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dest.	destillatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ddNTP / dNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat / Desoxy-Nukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
F	Faktor (z.B. FII ,FVII)
g	Gramm bzw.Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
GGCX	γ-glutamyl-Carboxylase
Gla	γ-Carboxyglutamat
Glu	Glutamat
hFIX	humaner FIX
hVKORC1	humane VKORC1
h, min, s, d	Stunde, Minute, Sekunde, Tag
kDa	Kilodalton
M	Molar, mol pro Liter
m, μ, n, p	milli-, mikro-, nano-, pico-
mRNA	messenger RNA
MWCO	“Molecular weight Cut off”
N-Terminus	Amino-Terminus
NQO1	NAD(P)H:Quinon akzeptor oxidoreduktase
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (U/min)
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
TM-Domäne	Transmembrandomäne bzw. –helix

Abkürzungsverzeichnis

VKCFD1 / 2	Vitamin K clotting factor deficiency type1 / type2
VKD-Proteine	Vitamin K-abhängige Proteine
VKH ₂	Vitamin K-Hydrochinon
VKO	Vitamin K 2,3-Epoxid
VKOR	Vitamin K 2,3-Epoxid-Oxido-Reduktase
VKORC1	Vitamin <i>k</i> epoxide reductase complex subunit 1
VKORC1L1	Vitamin <i>k</i> epoxide reductase complex subunit 1 – like 1
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
wt	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Anhang

A.1 Primersequenzen

Mutagenese-Primer: Mutationen in der hVKORC1

Die jeweiligen Punktmutationen sind hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
	Humane VKORC1-Mutationen
A26T-F	CGCTCTAC A CGCTGCACGTGAAGGCGGCGCG
A26T-R	GTGCAGCGTGTAGAGCGAGAGCACTAAGCC
A26P-F	CGCTCTAC C CGCTGCACGTGAAGGCGGCGCG
A26P-R	GTGCAGCG G GTAGAGCGAGAGCACTAAGCC
L27V-F	GTGCTCTCGCTCTACGCG G TGCACGTGAAGGCGGCGCG
L27V-R	CGCCGCCTTCACGTGCAC C CGCGTAGAGCGAGAGCAC
H28Q-F	GCTCTACGCGCTGCA A GTGAAGGCGGCGCGCG
H28Q-R	GCGCGCCGCCTTCACTTGCAGCGCGTAGAGC
V29L-F	CTCTACGCGCTGCACTTGAAGGCGGCGCGCG
V29L-R	CGCGCGCCGCCTTCA A GTGCAGCGCGTAGAG
D36G-F	CGGCGCGCGCCCGGG G CCCGGGATTACCGCGC
D36G-R	GCGCGGTAATCCCGG C CCCGGGCGCGCGCCG
D36Y-F	GCGGCGCGCGCCCGGTACCGGGATTACCGCG
D36Y-R	CGCGGTAATCCCGGT A CCCGGGCGCGCGCCGC
V45A-F	GCGCGCTCTGCGACG C GGGCACCGCCATCAG
V45A-R	CTGATGGCGGTGCC C CGTCGCAGAGCGCGC
V54L-F	GTTTCGCGC C TCTTCTCCTCCAGGTGG
V54L-R	AGGAGAAGAG G GCGCGAACAGCTGATGGCG
S52L-F	CCGCCATCAGCTGTTT G CGCGTCTTCTCCTC
S52L-R	GAGGAGAAGACGCGC A AACAGCTGATGGCGG

Anhang

S52W-F	CCGCCATCAGCTGTT G GCGCGTCTTCTCCTC
S52W-R	GAGGAGAAGACGCGCC C AACAGCTGATGGCGG
S56F-F	TGTT C GCGCGTCTTCTTCTCCAGGTGGGGC
S56F-R	GCCCCACCTGGAG A AAGAAGACGCGCGAACA
R58G-F	CGCGTCTTCTCCTCC G GGTGGGGCAGGGGTT
R58G-R	AACCCCTGCCCCACCC C GGAGGAGAAGACGCG
W59C-F	CTTCTCCTCCAGGTGTGGCAGGGGTTTCGGG
W59C-R	CCCGAAACCCCTGCCAC A CCTGGAGGAGAAG
W59L-F	TCTTCTCCTCCAGGT T GGGCAGGGGTTTCGG
W59L-R	CCGAAACCCCTGCC A ACCTGGAGGAGAAGA
W59R-F	GTCTTCTCCTCCAGG C GGGGCAGGGGTTTCG
W59R-R	CGAAACCCCTGCCCC G CCTGGAGGAGAAGAC
V66G-F	GGGGTTTCGGGCTGG G GGAGCATGTGCTGGG
V66G-R	CCCAGCACATGCTCC C CCAGCCCGAAACCC
V66M-F	AGGGGTTTCGGGCTG A TGGAGCATGTGCTGG
V66M-R	CCAGCACATGCTCC A TCAGCCCGAAACCCCT
G71A-F	TGGAGCATGTGCTGG C ACAGGACAGCATCCT
G71A-R	AGGATGCTGTCCTGT G CCAGCACATGCTCCA
N77S-F	CATCCTC A GTC A ATCCAACAGCATATTCGGT
N77S-R	TGGATTG A CTGAGGATGCTGTCCTGTCCCAG
N77Y-F	GCATCCT T ATCAATCCAACAGCATATTCG
N77Y-R	TGGATTG A TAGAGGATGCTGTCCTGTCCA
L128R-F	TCCTGTTCTTCGTG C GCTATGATTTCTGCAT
L128R-R	ATGCAGAAATCATAG C GCACGAAGAACAGGA
I123N-F	GGCCTGGA A CCTGTTCTTCGTGCTCTATGA
I123N-R	AGAACAGG T TCCAGGCCAGGTAGACAGAAC

Anhang

Y139H-F	TCACCACCC C ATGCTATCAACGTGAGCCTGAT
Y139H-R	GATAGCAT G GGTGGTGATACAAACAATGCA
	VKORC1-Mutationen <i>Rattus norvegicus</i>
Y139F-F	GTTTGTATCACCACCTTTGCTATCAACGTGAG
Y139F-R	CTCACGTTGATAGCAA A GGTGGTGATACAAAC
	Funktionelle VKORC1-Mutationen
TYA>TYV-F	GTATCACCACCTATGTTATCAACGTGAGCCT
TYA>TYV-R	AGGCTCACGTTGATA A CATAGGTGGTGATAC
TYA>LIV-F	ATTGTTTGTATCACC C T C ATTGTTATCAACGTGAGC
TYA>LIV-R	GCTCACGTTGATAACA A T G A GGGTGATACAAACAAT

Herstellung von Megaprimern: Klonierung humaner cDNA in den Vektor pIRES

Bezeichnung	Sequenz 5´- 3´
MSC B-C1-F	AGCTTGCCACAACCCGGGATCCTCTAGAGTATGGCGGCTCCCGT CCTG
MSC B-C1-R	CTCACTAAAGGGAAGCGGCCGCCGGGTCGTCAGTCCTGCTTG GGTTGC
MSC B-L1-F	AGCTTGCCACAACCCGGGATCCTCTAGAGTATGGCGGCTCCCGT CCTGC
MSC B-L1-R	CTCACTAAAGGGAAGCGGCCGCCGGGTCGTCAGTCCTGCTTG GGTTGC
MSC B-NQ01-F	AGCTTGCCACAACCCGGGATCCTCTAGAGTATGGTCGGCAGAAG AGCA
MSC B-NQ01-R	CTCACTAAAGGGAAGCGGCCGCCGGGTCGTCATTTTCTAGCTT TGATC
MSC A-F9-F	TACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCCTATGCAGCGCGTGAA CATGA

Herstellung von Megaprimern:**Klonierung in die Vektoren pFastBac1 und pFastBac Dual**

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
PH-C1-F	GCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGA CGATGGGCAGCACCTGGGGGAGC	<i>VKORC1</i> in pFastBac1
PH-C1-R	AGATTGCGAAAGCGGCCGCGACTAGTGAG CTTCAGTGCCTCTTAGCCTT	
PH-L1-F	GCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGA CGATGGCGGCTCCCGTCCTGC	<i>VKORC1L1</i> in pFastBac1
PH-L1-R	AGATTGCGAAAGCGGCCGCGACTAGTGAG CTTCAGTCCTGCTTGGGTTGC	
PH-NQO1-F	GCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGA CGATGGTCGGCAGAAGAGCA	<i>NQO1</i> in pFastBac1
PH-NQO1-R	AGATTGCGAAAGCGGCCGCGACTAGTGAG CTTCATTTTCTAGCTTTGATC	
P10-F9-F	TGATCACCCGGGATCTCGAGCCATGGTGC TATGCAGCGCGTGAACATGA	<i>F9</i> in pFastBac Dual
P10-F9-R	CCCGGTACCGCATGCTATGCATCAGCTGC TTTAAGTGAGCTTTGTTTTTTC	
PH-GGCX-F	GCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGA CGATGGCGGTGTCTGCCGGGTC	<i>GGCX</i> in pFast BacDual
PH-GGCX-R	AGATTGCGAAAGCGGCCGCGACTAGTGAG CTTCAGAACTCTGAGTGGACAG	

Herstellung von Megaprimern:**Klonierung der *VKORC1* cDNA in den pcDNA3.1myc Vektor**

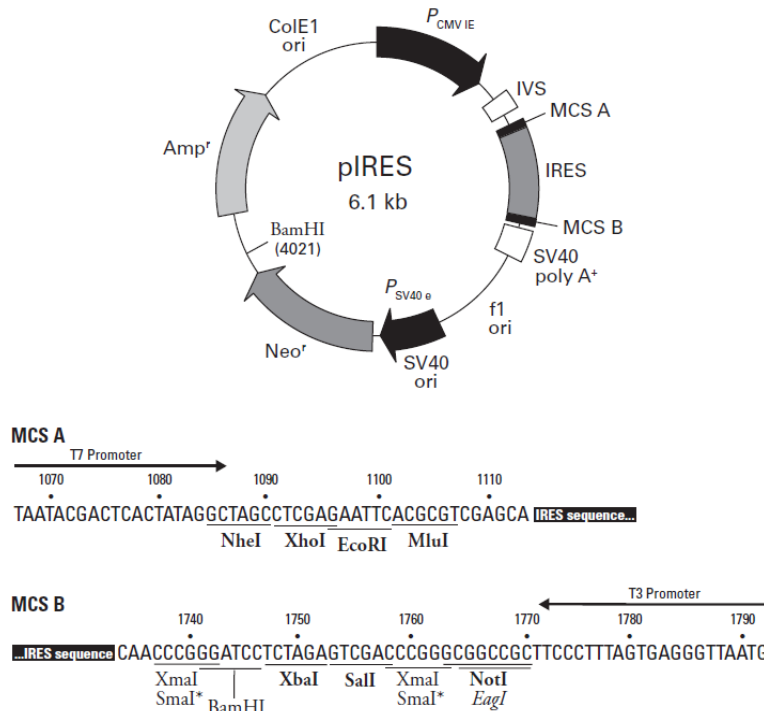
Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
C1-pcDNA3.1-F	AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTATGGGCAGCACCTG GGGGAGC
C1-pcDNA3.1-R	GCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGGTGCCTCTTAG CCTTGCCCTG

Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
	pIRES Vektor
MSCA-F	GTGTCCACTCCCAGTTCAATT
MSCA-R	AGAGGGGGCGGAATTGGCCGCC
MSCB-F	AACCACGGGGACGTGGTTTTTC
MSCB-R	TCTGCTCGAAGCATTAAACCCT
	pFastBac1 und pFastBac Dual Vektor
PHpro-F	AAATGATAACCATCTCGC
PHpro-R	GAAATTTGTGATGCTATTGC
P10pro-F	CGGACCTTTAATTCAACCC
P10pro-R	GTCTCCTTCCGTGTTTCAG
	Bacmid
M13-F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG
	pcDNA3.1/myc-His Vektor
T7-F	TAATACGACTCACTATAGG
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG

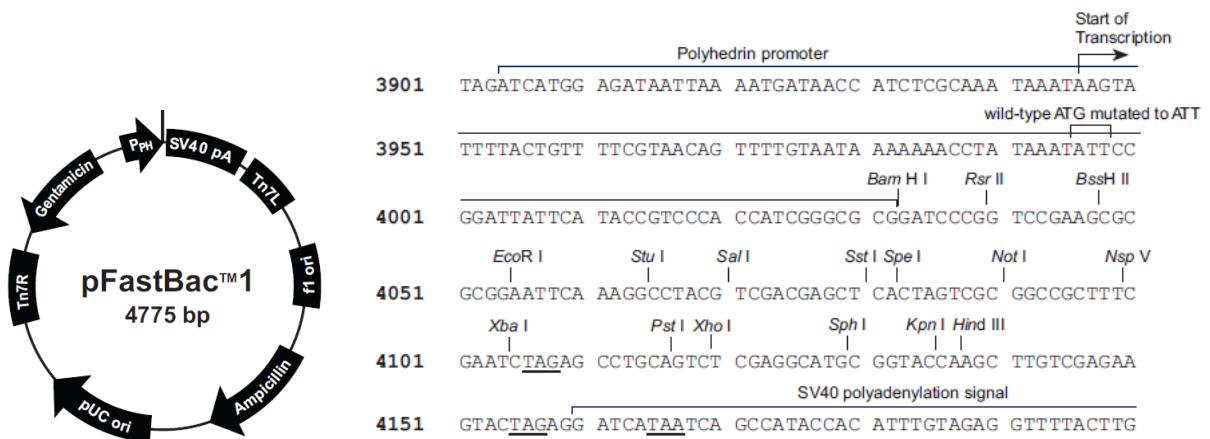
A.2 Vektorkarten

Cat. No. 6



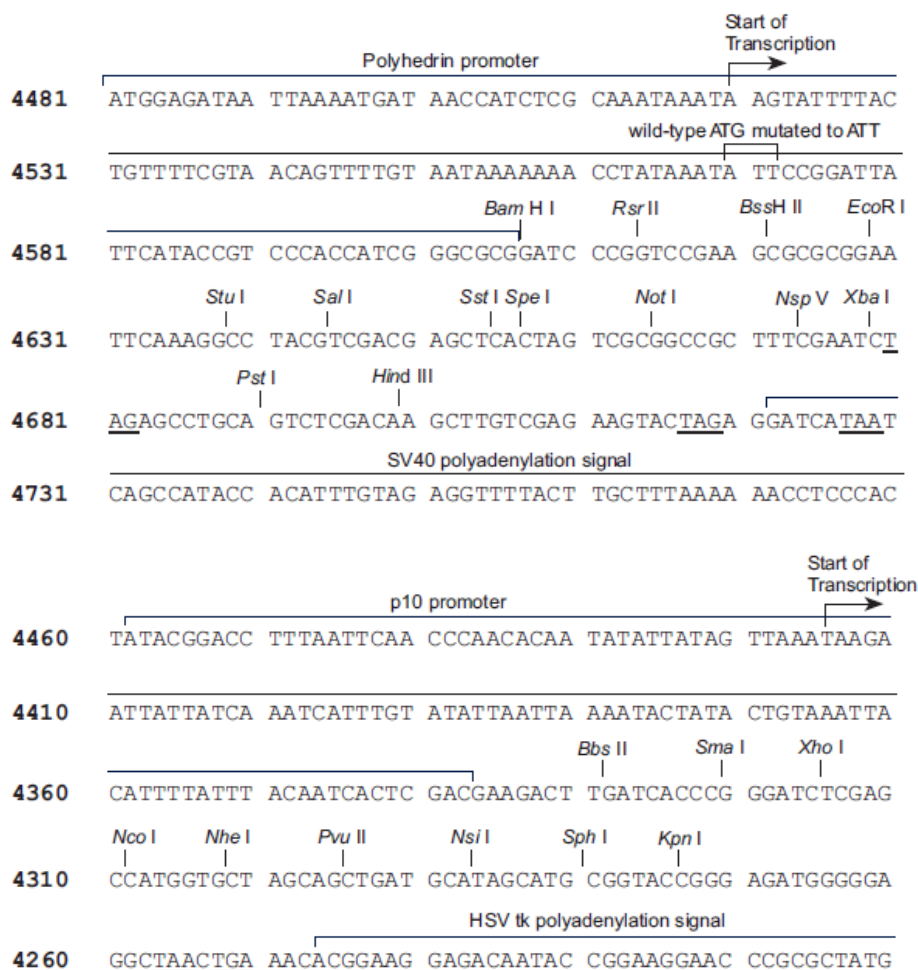
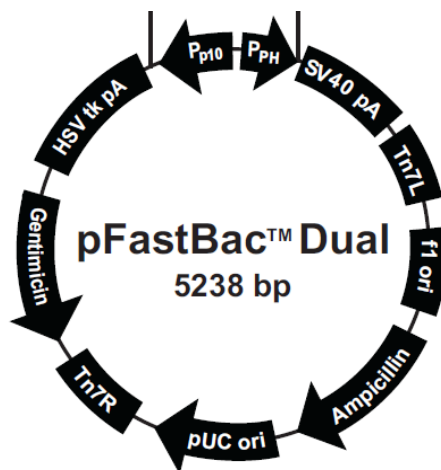
Vektorkarte pIRES.

In die MSC A wurde die hF9 cDNA, in MSC B die cDNA der *VKORC1*, *VKORC1L1* oder der *NQO1* kloniert.



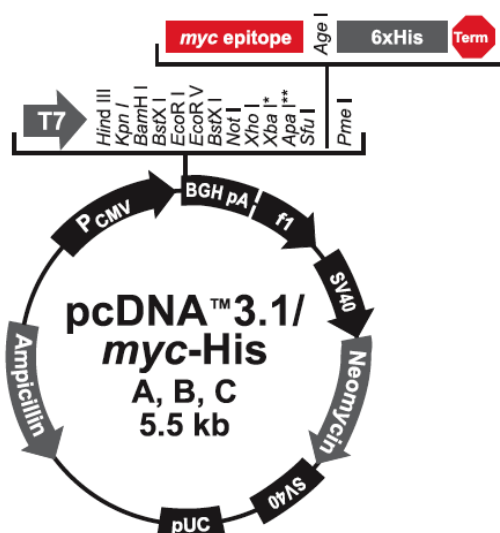
Vektorkarte pFastBac1.

In die MSC wurde die cDNA der *VKORC1*, *VKORC1L1* oder der *NQO1* kloniert.



Vektorkarte pFastBacDual.

In die MSC, die unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors steht wurde die cDNA der GGCX und in die unter der Kontrolle des p10-Promotors stehende MSC wurde die F9 cDNA kloniert.



861 ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT TAAG CTT GGT ACC GAG CTC GGA
 Leu Gly Thr Glu Leu Gly

923 TCC ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT ATC CAG CAC AGT GGC GGC CGC
 Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg

977 TCG AGT CTA GAG GGC CCG CCG TTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT
 Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

1028 CTG AAT ATG CAT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTT AAACCCGCTG
 Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His ***

1081 ATCAGCCTCG ACTGTGCGTT CTAGTTGCCA

Vektorkarte pcDNA3.1myc-His B.

In die MSC wurde die cDNA der *VKORC1* sowie ihre Varianten kloniert.

Publikationsverzeichnis

Publikationen:

1. Fregin A* and Czogalla KJ*, Gansler J, Rost S, Taverna M, Watzka M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. A new cell culture-based assay quantifies VKORC1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the DTT-driven VKOR assay. J Thromb Haemost. 2013 Mar 2. doi: 10.1111/jth.12185.
** A. Fregin und K.J. Czogalla sind gleichberechtigte Autoren*
2. Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln AC, Watzka M, Westhofen P, Oldenburg J. Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. Das Manuskript wurde am 10.05.2013 in der Fachzeitschrift "Blood" eingereicht.

Posterpräsentationen:

"Quantitative analysis of mRNA-Expression of genes involved in the vitamin K-cycle in mouse-tissue"

40. Hamburger Hämophilie Symposium (2009)

"NQO1- A bypass of the vitamin K-cycle?"

54. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Haemostase, GTH 2010

"NQO1 driven reduction of Vitamin K-Quinone is no bypass mechanism of Vitamin K-cycle in mice"

41. Hamburger Hämophilie Symposion (2010)

"Is the enzyme NQO1 a bypass of the vitamin K-cycle?"

43. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 2010

“Mutations in VKORC1: a new assay for functional investigation”

44. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 2011

Posterpreise:

„In vitro and in vivo comparison of VKORC1 Mutations leading to Warfarin resistance”
XXIII Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis (2011)

“New assay for quantitative determination of Warfarin resistance”

42. Hamburger Hämophilie Symposion (2011)

Vorträge:

„Functional Investigation of Human VKORC1 Mutations”

55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Haemostase, GTH 2011

„New cell based assay to study human VKORC1 Mutations: A26P, W59L, and L128R cause highly resistant Warfarin phenotype”

56. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Haemostase, GTH 2012

„Human VKORC1 mutations (His28Gln, Trp59Leu, Val66Met) investigated by the new cell-based assay exhibit warfarin resistance phenotypes not detected by the “classical” DTT-driven VKOR assay”

XXIV Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis (2013)