

**Biochemische und pathophysiologische Charakterisierung
des *Tissue factor pathway inhibitors* (TFPI) und seiner
natürlich vorkommenden Mutante [P151L]TFPI**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Elmar Thyzel

Bad Oeynhausen / Bielefeld

Februar 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek, Bad Oeynhausen

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey, Bielefeld

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2006

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Professor Dr. med. Knut Kleesiek

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
Bad Oeynhausen

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Knut Kleesiek für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Professor Dr. Jürgen Frey, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Christian Götting danke ich für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie die Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Sabine Siegling, Herrn Dr. Joachim Kuhn und Herrn PD Dr. Thomas Brinkmann danke ich für viele hilfreiche Ratschläge und Anregungen.

Meinen Kollegen Frau Dr. Veronika Schulz, Herrn Dipl.-Biochem. Christian Prante, Frau Dr. Sandra Müller, Frau Dipl.-Biol. Manuela Schöttler, Frau Dipl.-Biochem. Sylvia Schön und Frau Dipl.-Biol. Doris Hendig danke ich für die gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit in Labor 11.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, insbesondere bei Frau Marlen Ewald und Frau Alexandra Adam, bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial und hilfreiche Anregungen danke ich Herrn Professor Dr. Hans-Rudolf Tinneberg, Frauenklinik der Universität Gießen.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V., Sankt Augustin, danke ich für die Förderung meines Promotionsvorhabens.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich für ihre stete Unterstützung.

Inhalt

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1.	Hämostase	2
2.1.1.	Der extrinsische Weg der Blutgerinnung	3
2.1.2.	Der intrinsische Weg der Blutgerinnung	4
2.1.3.	Gleichgewicht von Hämostase und Fibrinolyse	4
2.2.	Der <i>Tissue factor pathway inhibitor</i> (TFPI)	5
2.2.1.	Struktur des TFPI	6
2.2.2.	Synthese und Metabolismus des TFPI	7
2.2.3.	Pathobiochemie des TFPI	8
2.2.4.	Polymorphismen des TFPI-Gens	8
2.3.	TFPI in humanen Reproduktionsflüssigkeiten	10
2.4.	Homozystein und Hyperhomozysteinämie	10
3.	Gegenstand der Arbeit	12
4.	Ergebnisse	13
4.1.	Klonierung und Expression des WT-TFPI und der [P151L]TFPI-Mutante	13
4.2.	Immunologischer Nachweis des rWT-TFPI und r[P151L]TFPI	13
4.2.1.	Quantitativer immunologischer TFPI-Nachweis	13
4.2.2.	Quantitative Bestimmung der TFPI-Aktivität	14
4.2.3.	Immunologischer Nachweis mit Anti-V5-Antikörpern	15
4.3.	Charakterisierung rekombinanten WT- und [P151L]TFPI	16
4.3.1.	Untersuchung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Inhibitoren	16
4.3.2.	Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung der rekombinanten Inhibitoren auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT)	20
4.3.2.1.	Wirkung des durch BSA-Zugabe bedingten Verdünnungseffekts auf die aPTT	20
4.3.2.2.	Quantifizierung der durch die rekombinanten Inhibitoren bedingten aPTT-Verlängerung	21
4.4.	TFPI-Quantifizierung in humanen Reproduktionsflüssigkeiten	23
4.4.1.	Bestimmung der TFPI-Konzentration in humanem Seminalplasma	23
4.4.1.1.	TFPI-Konzentration im Seminalplasma gesunder Samenspender	23
4.4.1.2.	TFPI-Konzentration im Seminalplasma infertiler Männer	23

4.4.1.3. Vergleich der TFPI-Konzentration im Seminalplasma fertiler und infertiler Männer	23
4.4.2. TFPI-Quantifizierung in humaner ovarieller Follikelflüssigkeit	25
4.4.2.1. Altersabhängigkeit der TFPI-Konzentration in der Follikelflüssigkeit	25
4.4.2.2. Vergleich von OHSS- und Nicht-OHSS-Patientinnen	26
4.4.2.3. Untersuchung klinisch-chemischer Parameter, die den Erfolg einer IVF beeinflussen	27
4.5. TFPI und Hyperhomozysteinämie	28
4.5.1. Klinisch-chemische Parameter	28
4.5.2. Untersuchung der hHcy-Patienten und Blutspender auf geschlechts-spezifische Unterschiede hin	31
4.6. Untersuchungen zur Glykosaminoglykan-indizierten TFPI-mRNA Expression in <i>Ea.hy 926</i> - sowie <i>SW 1353</i> -Zellen	32
4.6.1. Etablierung einer <i>Real-Time</i> PCR-Methode zur Quantifizierung der TFPI-Genexpression	32
4.6.2. Stimulation von <i>Ea.hy 926</i> -Zellen mit LMWH	34
4.6.3. Stimulation von <i>Ea.hy 926</i> -Zellen mit UFH	35
4.6.4. Stimulation von <i>Ea.hy 926</i> -Zellen mit Heparansulfat	36
4.6.5. Stimulation von <i>Ea.hy 926</i> -Zellen mit Chondroitinsulfat	37
4.6.6. Inkubation von <i>SW 1353</i> -Zellen mit Chondroitinsulfat	37
4.7. Wirkung von Homozystein auf Zellproliferation und Apoptose von <i>Ea.hy 926</i> - sowie <i>SW 1353</i> -Zellen	38
4.7.1. Wirkung auf die Zellproliferationsrate	38
4.7.2. Durchflußzytometrische Messungen zur Bestimmung apoptotischer Zellen	39
4.7.2.1. Etablierung einer durchflußzytometrischen Analyse zur Detektion apoptotischer Zellen	39
4.7.2.2. Durchflußzytometrische Messungen zur Unterscheidung von vitalen und nekrotischen Zellen	39
4.7.2.3. Durchflußzytometrische Messungen zur Optimierung des Apoptose-Protokolls	39
4.7.3. Wirkung des Homozysteins auf Zellproliferation und Apoptose	40
4.8. Einfluß von TFPI auf die Zellproliferation und Apoptose von <i>Ea.hy 926</i> - und <i>SW 1353</i> -Zellen	42
4.8.1. Einfluß des TFPI auf die Zellproliferationsrate	42
4.8.2. Durchflußzytometrische Messungen der mit TFPI inkubierten <i>Ea.hy 926</i> - und <i>SW 1353</i> -Zellen zur Quantifizierung apoptotischer Zellen	43

5.	Diskussion	46
5.1.	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rWT- und r[P151L]TFPI	46
5.2.	Untersuchung der inhibitorischen Wirkung der rekombinanten Proteine auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT)	48
5.3.	Bedeutung des TFPI für die männliche Fertilität	49
5.4.	TFPI-Konzentration in ovarieller Follikularflüssigkeit während der <i>In-vitro</i> Fertilisation (IVF)	50
5.5.	Untersuchungen zur Korrelation zwischen TFPI- und Homozystein-Leveln unter besonderer Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Unterschiede	51
5.6.	Induktion der TFPI mRNA-Expression in Endothelzellen <i>in vitro</i>	52
5.7.	Ausblick	54
6.	Methoden	56
6.1.	Molekularbiologische Methoden	56
6.1.1.	Agarosegel-Elektrophorese	56
6.1.2.	Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	56
6.1.3.	DNA-Konzentrationsbestimmung	57
6.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
6.1.5.	<i>Real-Time</i> PCR am <i>Light-Cycler</i>	58
6.1.6.	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	61
6.1.7.	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	61
6.1.8.	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem <i>TOPO TA Cloning Kit</i>	62
6.1.9.	Nukleinsäureextraktion und –reinigung	62
6.1.9.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (<i>Escherichia coli</i>)	62
6.1.9.2.	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	62
6.1.10.	RNA-Formamid-Agarose-Gelelektrophorese	63
6.1.11.	Reverse Transkriptase-PCR (cDNA-Synthese)	63
6.1.12.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	63
6.1.13.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	64
6.1.14.	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	64
6.2.	Proteinchemische Methoden	65
6.2.1.	Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Lösungen	65
6.2.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	65
6.2.3.	Bestimmung der modifizierten Thromboplastinzeit (aPTT)	67
6.2.4.	Chromogener TFPI-Aktivitätstest	68
6.2.5.	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rekombinanten TFPI	68
6.3.	Immunologische Methoden	70

6.3.1. Dot-Blot-ELISA auf PVDF-Membran	70
6.3.2. Western-Blot	70
6.3.3. Quantitativer immunologischer Nachweis der Gesamt-TFP-Konzentration	70
6.3.4. Quantitative Bestimmung von Gesamt-Trijodthyronin (Gesamt-T ₃)	71
6.3.5. Quantifizierung von freiem Thyroxin (freiem T ₄)	72
6.3.6. Quantitative Bestimmung von Thyreotropin (TSH)	72
6.3.7. Quantitative immunologische Homozysteinbestimmung	72
6.4. Zellkultur	73
6.4.1. Kultivierung von Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)	73
6.4.1.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i> in Flüssigkultur und auf Festmedien	73
6.4.1.2. Kryokonservierung von <i>Escherichia coli</i>	73
6.4.1.3. Transformation von <i>TOP10</i> -Zellen	73
6.4.2. Kultivierung von Insektenzellen	74
6.4.2.1. Kultivierung von <i>High Five</i> -Insektenzellen in Adhäsionskultur	74
6.4.2.2. Kultivierung von <i>High Five</i> -Insektenzellen in Suspensionskultur	74
6.4.2.3. Kryokonservierung von Insektenzellen	74
6.4.2.4. Bestimmung der Zellzahl	75
6.4.2.5. Transfektion von <i>High Five</i> -Insektenzellen	75
6.4.2.6. Selektion stabiler <i>High Five</i> -Zellklone	76
6.4.3. Kultivierung humaner Zellen	77
6.4.3.1. Kultivierung der verschiedenen humanen Zelllinien	77
6.4.3.2. Kryokonservierung humaner Zellen	77
6.5. <i>WST-1</i> -Zellproliferationstest	78
6.6. Nachweis apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie	79
6.7. Quantitative Bestimmung von Triglyzeriden	79
6.8. Enzymatische Bestimmung von LDL Cholesterin im Serum	80
7. Material und Geräte	81
7.1. Zelllinien	81
7.1.1. Eukaryotische Zelllinien	81
7.1.2. Bakterienstamm <i>Escherichia coli</i>	81
7.2. Zellkulturmedien	81
7.3. Reagenzien	82
7.4. Reagenziensätze	84
7.5. Puffer und Lösungen	84
7.6. sonstige Materialien	85
7.7. Geräte	85

7.8.	Softwareprogramme und Datenbanken	86
8.	Abkürzungen	87
9.	Literatur	91
10.	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	99

1. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit dem *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), einem *Kunitz*-Typ Inhibitor des extrinsischen Weges der Blutgerinnung, sowie dessen natürlich vorkommender Mutante [P151L]TFPI. Beide Proteine wurden rekombinant in *High Five*-Insektenzellen dargestellt, um für eine Charakterisierung ausreichende Mengen herzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die beiden rekombinanten Inhibitoren bezüglich ihrer Bindungsaffinität zu verschiedenen physiologischen Liganden wie *Tissue factor*, Faktor VIIa, Faktor Xa, LDL, Lipoprotein(a), Chondroitinsulfat A/C sowie unfraktioniertem (UFH) und niedermolekularem Heparin (LMWH) signifikant unterscheiden. So zeigte r[P151L]TFPI in allen Fällen eine höhere Bindungsaffinität zu den immobilisierten Liganden als rWT-TFPI. Eine besonders hohe Bindungsaffinität konnte zu den Glykosaminoglykanen Chondroitinsulfat A und C sowie zu UFH und LMWH nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgte eine Charakterisierung beider Proteine auf Grund ihrer inhibitorischen Wirkung auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT). Hier bewirkten beide Inhibitoren eine deutliche, konzentrationsabhängige Verlängerung der aPTT, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte TFPI erstmalig in humanem Seminalplasma nachgewiesen und zusätzlich gezeigt werden, daß das Seminalplasma infertiler Männer signifikant erniedrigte TFPI-Konzentrationen aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die TFPI-Konzentration in der Follikelflüssigkeit (hFF) von Frauen, die sich einer *In vitro* Fertilisation (IVF) unterziehen, im Vergleich zum Plasma um den Faktor vier erhöht ist und daß diese Erhöhung unabhängig vom Auftreten des Ovariellen Hyperstimulationssyndroms (OHSS) sowie dem Erfolg der IVF ist. Es konnte zudem erstmalig eine Korrelation zwischen der TFPI-Konzentration in hFF und dem Alter der IVF-Patientinnen nachgewiesen werden. Neben der Bedeutung des TFPI für die männliche Fertilität und das Follikelwachstum wurde auch gezeigt, daß Patienten, die unter einer Hyperhomozysteinämie (hHcy) leiden, signifikant erhöhte TFPI-Plasmakonzentrationen aufweisen, wobei dieser Effekt bei Frauen wesentlich stärker ausgeprägt war als bei Männern. Dies liefert neben einem Erklärungsansatz für das erhöhte Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen von hHcy-Patienten auch ein Anzeichen für eine hHcy-bedingte Aktivierung des vaskulären Endothels.

Im dritten Teil dieser Arbeit konnte mittels *Real Time PCR* nachgewiesen werden, daß es bei therapeutischer Gabe von UFH wie auch LMWH zusätzlich zur prompten TFPI-Freisetzung von der Oberfläche sowie aus intrazellulären Speichern endothelialer Zellen auch zu einer Aktivierung der *de novo*-TFPI-Synthese kommt. Dieser Effekt war beim ebenfalls stark negativ geladenen Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat hingegen nicht zu beobachten.

2. Einleitung

2.1. Hämostase

Um bei Verletzungen das Auftreten größerer Blutverluste zu vermeiden, besitzt der menschliche Organismus das System der Hämostase (Blutstillung) für dessen Funktionsfähigkeit das koordinierte Zusammenwirken der drei Komponenten Blutgefäße, Thrombozyten und plasmatisches Gerinnungssystem notwendig ist.

Nach einer Verletzung verläuft die Blutstillung in mehreren Phasen. In der ersten Phase (primäre Hämostase) kommt es durch Reizung glatter Muskelzellen zunächst zu einer reflektorischen Kontraktion der Blutgefäße. Diese wird unterstützt durch die Freisetzung vasokonstriktischer Substanzen (Serotonin, Katecholamine, Thromboxan A_2) aus den Thrombozyten und der verletzten Gefäßwand. Diese Kontraktion bewirkt außerdem eine Verlangsamung des Blutstromes in den Gefäßen der betroffenen Region, welche die zelluläre und plasmatische Blutgerinnung zusätzlich begünstigt. Den ersten Schritt der zellulären Phase der Hämostase stellt die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagenfasern dar, welche bei Verletzung des Gefäßendothels freigelegt werden. Diese Anhaftung der Thrombozyten erfolgt über Membranglykoproteine an ϵ -Lysingruppen der Kollagenmoleküle. Danach kommt es zur Freisetzung verschiedener Substanzen aus den Granula der angehefteten Plättchen, von denen die wichtigsten ADP, Thromboxan A_2 , Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Serotonin und Katecholamine sind. Außerdem werden an der Thrombozytenoberfläche Phospholipide verfügbar, an die eine Adsorption von plasmatischen Gerinnungsfaktoren erfolgt. ADP, PAF und Thromboxan A_2 begünstigen die gleichzeitig mit der Freisetzungsreaktion stattfindende irreversible Aggregation der Plättchen. Es bildet sich somit ein thrombozytärer Gefäßpfropf aus, der ein weiteres Austreten von Blut aus dem verletzten Gefäß verhindert. Gleichzeitig wird durch Kontaktaktivierung an Kollagenfasern des geschädigten Endothels und Freisetzung von *Tissue factor* (TF) aus dem verletzten Gewebe das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert. Die plasmatische Gerinnung läuft aber zunächst nur an der Oberfläche und in der Umgebung der am Endothel anhaftenden und aggregierten Plättchen ab [1; 2].

Die fortschreitende Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems löst dann die zweite Phase der Blutstillung (sekundäre Hämostase) aus, die eigentliche plasmatische Gerinnung. Am Ende dieser Reaktionskette steht die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, dessen dreidimensionales Netzwerk den zunächst noch losen Thrombozytenpfropf durchdringt und ihn verfestigt [2; 3]. An der plasmatischen Blutgerinnung sind insgesamt 15 verschiedene Gerinnungsfaktoren beteiligt, von denen die meisten enzymatische Aktivität besitzen. Sie liegen im Plasma als inaktive Zymogene vor und werden im Laufe der Gerinnungskaskade stufenweise aktiviert. Einige zentrale Reaktionen der Gerinnungskaskade laufen in

Komplexen aus Gerinnungsfaktoren, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden ab. Die daran beteiligten Phospholipide stammen aus den Thrombozyten und dienen im Komplex als Matrix für die anderen beteiligten Komponenten. Modellhaft wird die plasmatischen Gerinnungskaskade in einen intrinsischen und einen extrinsischen Gerinnungsweg unterteilt, die bei der Aktivierung von Faktor X zusammenlaufen (Abb. 1). *In vivo* sind beide Wege für eine effektive Gerinnung erforderlich und daher auf vielfältige Weise miteinander verknüpft [3-5].

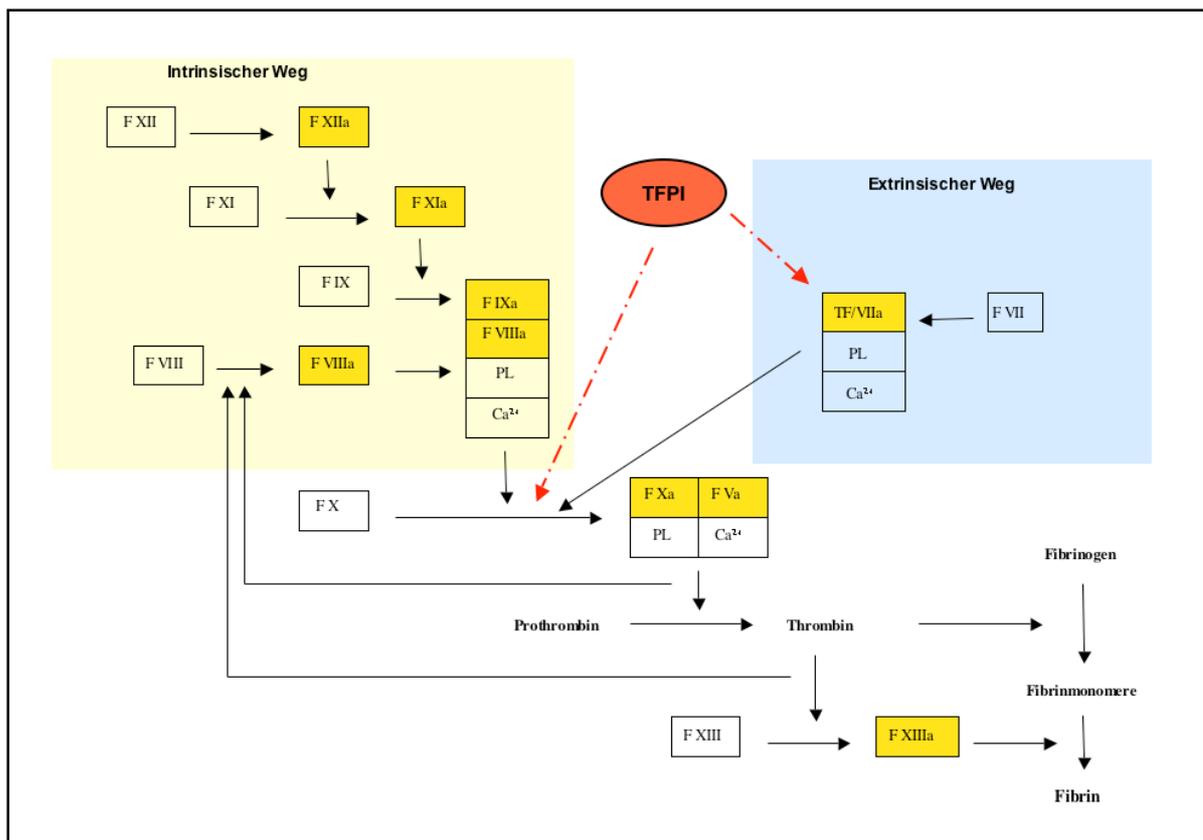


Abb. 1: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade und modellhafte Unterteilung in einen intrinsischen und extrinsischen Weg. Die durchgezogenen Pfeile kennzeichnen Aktivierungsreaktionen; die vom TFPI ausgehenden durchbrochenen Pfeile (rot) inhibitorische Wirkungen. (gelb = aktivierte Faktoren, PL = Phospholipide)

2.1.1. Der extrinsische Weg der Blutgerinnung

Die Aktivierung des extrinsischen Weges der Blutgerinnung erfolgt durch Faktor VII mit *Tissue factor* als Proteinkofaktor, der bei Gewebeerletzungen aus den Mikrosomen zerstörter Zellen freigesetzt wird, und läuft innerhalb von Sekunden ab. Der im Blut zirkulierende Faktor VII besitzt im Gegensatz zu den inaktiven Vorstufen von

Gerinnungsfaktoren bereits proteolytische Aktivität, die jedoch nur zusammen mit TF zur Gerinnungsaktivierung führt. Der TF/FVII-Komplex bildet in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an Phospholipidpartikeln einen Komplex, an dem die Aktivierung von Faktor X zu FXa erfolgt (Abb. 1). In einer positiven Rückkopplungsreaktion aktiviert der gebildete FXa Faktor VII zu FVIIa. Dadurch wird die Aktivierung von FX durch FVII erheblich gesteigert. Bei längerer Einwirkung von FXa auf FVIIa kommt es dann allerdings zur Inaktivierung durch Proteolyse. Dieser negative *Feedback*-Mechanismus führt somit zur Hemmung des Gerinnungsablaufs [1-3].

2.1.2. Der intrinsische Weg der Blutgerinnung

Die erste Reaktion des intrinsischen Weges, der innerhalb von Minuten abläuft, ist die Aktivierung von Faktor XII (Hagemann-Faktor); diese wird ausgelöst durch den Kontakt des FXII mit negativ geladenen Oberflächen. Dies können *in vitro* z.B. Glas, Harnsäure oder langkettige Fettsäuren sein; *in vivo* kann die Aktivierung an Kollagen oder Kallikrein erfolgen. Dadurch entstehen Bradykinin und verschiedene Spaltprodukte von FXII, unter anderem eine aktive Form (FXIIa), die *in vitro* Faktor XI zum aktiven FXIa spalten kann. Dieser wiederum aktiviert Faktor IX zu FIXa. FIXa wiederum bildet mit FVII, Kalziumionen und Phospholipiden den FX-Aktivator (Abb. 1) [1-3].

2.1.3. Gleichgewicht von Hämostase und Fibrinolyse

Da es auch im intakten Gefäßsystem unter physiologischen Bedingungen ständig, zumindest in einem geringen Umfang, zu Gerinnungsvorgängen und damit zur Fibrinbildung kommt, ist dem Hämostasesystem das fibrinolytische System gegenübergestellt. Dieses wirkt den Gerinnungsvorgängen entgegen, indem es das abgelagerte Fibrin auflöst. Dadurch daß Blutgerinnung und Fibrinolyse in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, wird gewährleistet, daß das Blut einerseits permanent im flüssigen Zustand bleibt, andererseits aber ein Blutverlust vermieden wird. Fibrinogen und Fibrin werden *in vivo* durch die Endopeptidase Plasmin abgebaut; ein proteolytisches Enzym, das im Blut und in zahlreichen Geweben in einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, vorliegt. Das Fibrinolyse-System kann einerseits im Rahmen des intrinsischen Weges der Blutgerinnung über den Faktor VII aktiviert werden, andererseits durch Aktivatoren (u-PA, t-PA), die aus verschiedenen Geweben des Organismus freigesetzt werden [2; 3].

Wird das natürliche Gleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse gestört, so gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie sich dieses auswirken kann. Zum einen in einer überschießenden Aktivierung der Blutgerinnung, zum anderen in einer verstärkten Blutungsneigung. Typischer Ausdruck einer überschießenden Gerinnungsaktivierung ist die Entstehung von Blutgerinnseln innerhalb von Blutgefäßen (Thrombosen). Eine erhöhte Thromboseneigung kann sowohl die Folge genetischer Prädisposition sein, als auch in Folge von Erkrankungen entstehen, bei denen durch einseitige Aktivierung der Blutgerinnung das hämostatische Gleichgewicht gestört ist.

Eine verstärkte Blutungsneigung ist ebenfalls häufig die Folge einer genetischen Prädisposition und entsteht meistens dadurch, daß einer der Gerinnungsfaktoren im Blut nicht in ausreichender Menge oder sogar überhaupt nicht gebildet werden kann. Wenn der Faktor VIII betroffen ist, spricht man von Hämophilie A, wenn zu wenig bzw. kein FIX gebildet wird, von Hämophilie B. Neben der erblichen Veranlagung können aber auch verschiedene erworbene Erkrankungen eine erhöhte Blutungsneigung bewirken [1; 4; 5].

2.2. Der *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI)

Die Regulation der Blutgerinnung erfolgt durch verschiedene Proteine, die entweder durch Proteolyse andere Faktoren aktivieren oder aber diese durch Bindung inhibieren. Innerhalb dieses Regulationsmechanismus ist der essentielle Inhibitor der initialen Gerinnungsreaktion der *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), der auch als *Lipoprotein-associated coagulation inhibitor* (LACI) oder *Extrinsic pathway inhibitor* (EPI) bezeichnet wird [5; 6].

TFPI gehört zur Familie der *Kunitz*-Typ-Inhibitoren und inhibiert den extrinsischen Weg der Blutgerinnung relativ schnell durch Bildung eines quarternären Komplexes mit Faktor Xa und dem FVIIa/TF-Komplex, weil der in diesem Komplex gebundene FXa nicht mehr für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Verfügung steht. Da der extrinsische Weg durch diese Reaktion sehr kurzlebig ist, muß die Aufrechterhaltung der Hämostase durch den intrinsischen Weg erfolgen [6]. Die bereits gebildeten geringen Mengen an FXa reichen dabei aus, um Thrombin zu bilden, welches dann FVIII aktiviert und so eine Verstärkung der Blutgerinnung bewirkt (Abb. 1).

Die Inhibierung des VII/TF-Komplexes und des FXa erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet TFPI an den FXa und hemmt dann über eine FXa-abhängige Reaktion den VII/TF-Komplex. Der erste Reaktionsschritt ist unabhängig von Ca^{2+} -Ionen, während der zweite diese erfordert. TFPI inhibiert den Komplex durch kompetitive Hemmung, indem es das Substrat imitiert. Obwohl die Anwesenheit von FXa wichtig ist, kann TFPI den FVIIa/TF-Komplex auch inhibieren, wenn kein aktivierter Faktor X vorliegt. Dazu ist jedoch eine etwa 50fach erhöhte

TFPI-Konzentration notwendig [7-8]. Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren wie ATIII, bildet TFPI einen festen quaternären Komplex und verhindert so, daß sich der *Tissue factor* weiter an der Hämostase beteiligt [7].

2.2.1. Struktur des TFPI

TFPI wird von einem auf Chromosom 2q31-q32 lokalisierten Gen codiert, das 125 kb groß ist und 9 Exons sowie 8 Introns umfaßt, wobei fast die Hälfte des Gens auf Exon 1 und 2 sowie Intron 1 und 2 entfällt, welche die 5'-nichtcodierende Region darstellen (45 kb). Exon 3 codiert für eine Signalsequenz, die nach dem Transport an die Zelloberfläche abgespalten wird sowie für den N-terminalen Bereich. Die Exons 4, 6 und 8 codieren für die Kunitz-Domänen $\delta 1$, $\delta 2$ und $\delta 3$; Exon 5 und 7 für die dazwischenliegenden Bereiche. Der positiv geladene C-Terminus wird von Exon 9 codiert. Die vollständige cDNA des TFPI umfaßt 1431 bp [9-14].

Von den insgesamt 18 Cysteinresten des Proteins sind jeweils 6 in den drei Kunitz-Typ-Domänen enthalten, deren Struktur sie durch die Bildung von Disulfidbrücken stabilisieren. TFPI enthält drei potentielle Asn-Glykosylierungsstellen, je eine in Domäne $\delta 2$, Domäne $\delta 3$ und der dazwischenliegenden Region [15]. Der C-Terminus enthält einen Bereich mit hoher Heparinbindungsaffinität, welche durch eine hohe positive Ladungsdichte (zahlreiche Arginin- und Lysinreste) bedingt ist (Abb. 2 & 3). Der Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen TFPI mit der anderer Spezies wie Ratten, Kaninchen, Affen und Hunden hat gezeigt, daß eine große Homologie besteht. Diese zeigt sich vor allem in der sehr stark konservierten Struktur der Kunitz-Typ-Domänen $\delta 1$, $\delta 2$ und $\delta 3$ [16].

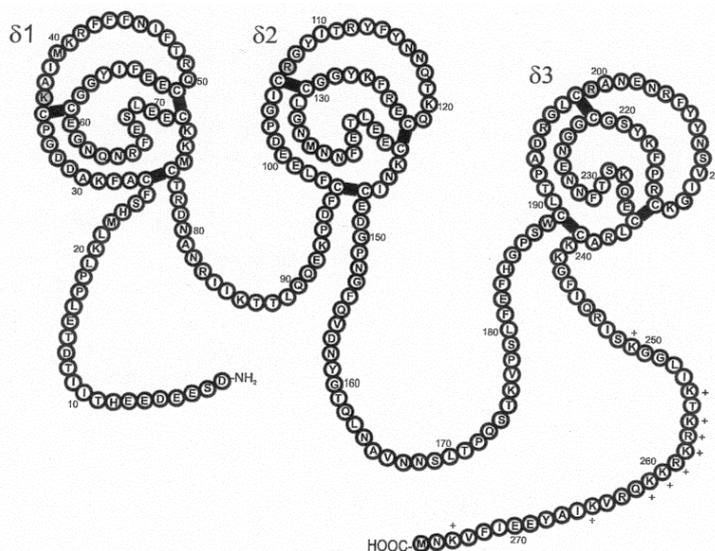


Abb. 2: Aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur des TFPI.

2.2.2. Synthese und Metabolismus des TFPI

In vivo wird TFPI primär durch das vaskuläre Endothel synthetisiert [17]; geringere Mengen werden aber auch durch Megakaryozyten, Monozyten, Makrophagen, Lungen-Fibroblasten, Synovialzellen und glatte Muskelzellen exprimiert [18-20]. Die im Endothel verschiedener Organe stattfindende TFPI-Expression scheint dabei von deren Bedarf abhängig zu sein. So exprimieren pulmonale und kardiale Endothelzellen die größten Mengen an TFPI [21].

In vivo kommt TFPI auf drei *Pools* verteilt vor. Vermutlich über Glykosaminoglykane und Proteoglykane an die Endotheloberfläche gebunden sind ca. 85 %, während weitere rund 10 % zum großen Teil an Lipoproteine gebunden im Plasma zirkulieren. 85 % des Lipoprotein-gebundenen TFPI sind dabei an LDL gebunden. Dieses LDL-gebundene TFPI hat eine Molekülmasse von 34 kDa, da ihm ein Teil der *Kunitz*-Typ Domäne $\delta 3$ sowie des C-Terminus fehlt. Ein geringer Anteil liegt gebunden an HDL vor und ist mit 41 kDa weniger stark verkürzt als die 34 kDa-Form [16]. Das aus Thrombozyten freigesetzte sowie das frei zirkulierende TFPI liegen mit 43 kDa (*Full-length-TFPI*) vor. Für die antikoagulatorische Aktivität ist ein intakter C-Terminus essentiell, daher zeigen die verkürzten Formen nur ca. 1 % der Aktivität des *Full-length-TFPI*. Nur die rund 10 % frei zirkulierendes Plasma-TFPI sind biologisch aktiv, während der an Lipoproteine gebundene Anteil nur geringe inhibitorische Aktivität aufweist. Ein geringer Teil (ca. 3 %) des TFPI wird in den Thrombozyten in speziellen Granula gespeichert. Dieses TFPI wird vermutlich von Megakaryozyten synthetisiert und nicht von den Thrombozyten aus dem Plasma aufgenommen. In Folge einer Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch Thrombin, wird TFPI aus den Granula freigesetzt und trägt so entscheidend zur TFPI-Konzentration am Wundort bei [22].

Bei gesunden Personen liegt die TFPI-Plasmakonzentration zwischen 54 und 124 ng/mL [23]. Während der Schwangerschaft finden sich erhöhte TFPI-Spiegel; im Gegensatz dazu sind sie bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen erniedrigt [24; 25].

Die Entfernung von TFPI aus der Zirkulation erfolgt vor allem durch Leber und Nieren und hier über den LRP (*LDL-Receptor related protein*/ $\alpha 2$ -Makroglobulin-Rezeptor). Die Aufnahme des TFPI findet in zwei Stufen statt. Zunächst bindet es über unspezifische Rezeptoren wie Heparansulfatproteoglykane (Syndecan, Glypican) an die Zelloberfläche. Im zweiten Schritt wird es, vermittelt durch den LPR, aufgenommen und abgebaut. Für die Bindung an die Zelloberfläche ist ein intakter C-Terminus erforderlich, daher wird *Full-length-TFPI* schneller aus der Zirkulation entfernt als die verkürzte Form [26].

2.2.3. Pathobiochemie des TFPI

Da TFPI eine zentrale Rolle in der Regulation der Blutgerinnung einnimmt, sollte eine Defizienz oder ein Aktivitätsdefekt dieses Gerinnungsinhibitors klinische Auswirkungen wie z.B. eine erhöhte Thromboseneigung zur Folge haben [18].

Ein *Knock-out* des TFPI-Gens führt bei Mäusen noch während der embryonalen Entwicklung zum Tode der Tiere, wodurch die Bedeutung des TFPI bereits in der pränatalen Entwicklung verdeutlicht wird. Da diese Ergebnisse vermutlich auf den Menschen übertragbar sind, erklärt dies, daß bisher keine Individuen mit TFPI-Defizienz gefunden wurden [27]. In den Fällen, in denen erniedrigte TFPI-Plasmaspiegel festgestellt wurden, konnte dies nicht eindeutig mit dem auftretenden Krankheitsbild wie z.B. erhöhter Thromboseneigung in Verbindung gebracht werden [28]. Erhöhte TFPI-Plasmakonzentrationen hingegen treten im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern wie Hyperlipoproteinämie, familiärer Hypercholesterinämie, Sepsis, inflammatorischen Prozessen, akutem Myokardinfarkt und insulinabhängigem Diabetes mellitus auf [29].

Da die *Tissue factor*-vermittelte Gerinnung bei Krankheiten wie akuter koronarer und vaskulärer Thrombose, arteriosklerotischer Thrombose, Schlaganfall und auch Krebs eine bedeutende Rolle spielt, könnte rekombinantes TFPI hier einen möglichen Therapieansatz darstellen [30; 31]. Eine wesentliche Rolle spielt TFPI auch bei malignen Erkrankungen. Die verstärkte Gerinnungsneigung und das dadurch bedingte erhöhte Thromboserisiko bei Krebspatienten entstehen vor allem durch die Fähigkeit von Tumorzellen Gerinnungsfaktoren wie *Tissue factor* zu produzieren. Neben dieser verstärkten Produktion prokoagulatorischer Faktoren findet sich aber auch eine Erhöhung des TFPI-Plasmaspiegels. So konnten bei ca. 50 % der Patienten mit Tumorerkrankungen der Lunge oder des Gastrointestinaltraktes erhöhte TFPI-Aktivitäten gemessen werden, während Patienten mit Leukämien dies kaum zeigten [32-35]. Vermutlich spielt TFPI eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion von Tumorzellen und fördert somit die Entstehung von Metastasen [34].

2.2.4. Polymorphismen des TFPI-Gens

Die erste Mutation innerhalb des TFPI-Gens wurde mit Hilfe des SSCP (*Single strand conformation polymorphism*)-Screenings gefunden [36]. Durch die 536C→T-Transition in Position 1 des Exons 7 wird innerhalb der Aminosäuresequenz in Position 151 Prolin durch Leucin substituiert (Abb. 3). Die Häufigkeit dieser Mutation lag bei 0,2 % in einem Kollektiv von 5120 Blutspendern und eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dieser Mutation

2.3. TFPI in humanen Reproduktionsflüssigkeiten

Bei der Follikelreifung während des Ovarialzyklus handelt es sich um einen komplexen Prozeß, dessen Verlauf von Gewebeumbau, Zelldifferenzierung und einer mehr als 400fachen Größenzunahme des Follikels geprägt ist. Letztere wird ausgelöst durch massiven Flüssigkeitseinstrom in die Follikelhöhle. Die Follikelflüssigkeit (*Liquor folliculi*, hFF) spielt hierbei eine entscheidende Rolle, ihre Zusammensetzung ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Um die Fluidität der Follikelflüssigkeit während des Follikelwachstums aufrecht zu erhalten, spielt die koordinierte Regulierung von Hämostase und Fibrinolyse im *Liquor folliculi* eine entscheidende Rolle [40-42]. Während dieses Wachstums kommt es, bedingt durch die schnelle Größenzunahme des Follikels, ständig zu Mikroläsionen, was im *Liquor folliculi* zu einer erhöhten TF-Konzentration führt, wodurch wiederum der extrinsische Weg der Blutgerinnung aktiviert wird. Da die Fluidität der Follikelflüssigkeit jedoch aufrechterhalten werden muß, liegen in dieser zahlreiche hämostatisch wie auch antikoagulatorisch wirkende Proteine (Antithrombin, Protein C, sulfatierte Proteoglykane, TFPI) vor [43-45]. Hier spielt der TFPI als zentraler Inhibitor des extrinsischen Weges der Blutgerinnung vermutlich eine entscheidende Rolle.

Menschliches Sperma enthält über 30 verschiedene Proteine, darunter einige Gerinnungs- und Liquefizierungsproteine, die üblicherweise eher mit dem hämostatischen und fibrinolytischen System in Verbindung gebracht werden (z.B. *Tissue factor*, Antithrombin, D-Dimere) [45-48]. Diese bewirken zunächst eine Gerinnung und anschließend wieder eine Liquefizierung des Ejakulats, wobei ihre Rolle noch nicht abschließend geklärt ist.

2.4. Homozystein und Hyperhomozysteinämie

Beim Homozystein (Hcy) handelt es sich um eine nicht-proteinogene schwefelhaltige Aminosäure, die durch intrazelluläre Demethylierung von Methionin entsteht. Im Plasma zirkuliert Hcy, hauptsächlich in seiner oxidierten Form, an Plasmaproteine gebunden. Kleinere Mengen an reduziertem Hcy und dem Disulfid Homozystin (Hcy-SS-Hcy) sind ebenfalls vorhanden [49-51]. Der intrazelluläre Hcy-Metabolismus wird durch zwei verschiedene Wege reguliert. Entweder wird Hcy durch Transsulfurierung irreversibel zu Cystein katabolisiert, wobei das Enzym Cystathionin β -Synthase (CBS) essentiell ist, das Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆) als Cofaktor benötigt (Abb. 4). Ein Großteil des Homozysteins wird jedoch zu Methionin remethyliert. Dieser Vorgang wird durch die

Methionin-Synthase katalysiert und erfordert Folat in Form von 5-Metylethyltetrahydrofolat als Cosubstrat und Kobalamin (Vitamin B₁₂) in Form von Methylcobalamin als Cofaktor (Abb. 4) [52]. Jede Störung dieser Reaktionen führt zu einer Hcy-Anreicherung im Blut. Es ist bekannt, daß MTHFR-Defizienz verschiedene klinisch relevante Symptome wie z.B. neurologische Dysfunktionen verursacht [53], während eine CBS-Defizienz die häufigste Ursache für eine Homozysteinurie ist, die durch geistige Retardierung, frühe Arteriosklerose sowie arterielle und venöse Thromboembolien gekennzeichnet ist [53; 54].

Erhöhte Hcy-Konzentrationen (Hyperhomozysteinämie) stellen einen etablierten Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar, wie in verschiedenen epidemiologischen Studien und Meta-Analysen gezeigt werden konnte [55-59]. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß ein Mangel an B-Vitaminen eine verbreitete Ursache erhöhter Hcy-Spiegel ist [60; 61] und daß die Gabe von B-Vitaminen, besonders von Folsäure, diese signifikant senken kann [62-64].

In *in vitro* Experimenten konnte zudem gezeigt werden, daß hohe Hcy-Konzentrationen die *Tissue factor* (TF)-Expression in humanen Endothelzellen und Monozyten induzieren [65; 66]. Diese endothelaktivierende Wirkung des Hcy lenkt das Augenmerk auf seine potentiellen koagulatorischen und antikoagulatorischen Wirkungen, da das vaskuläre Endothel der Hauptort der TFPI-Synthese im menschlichen Organismus ist [67].

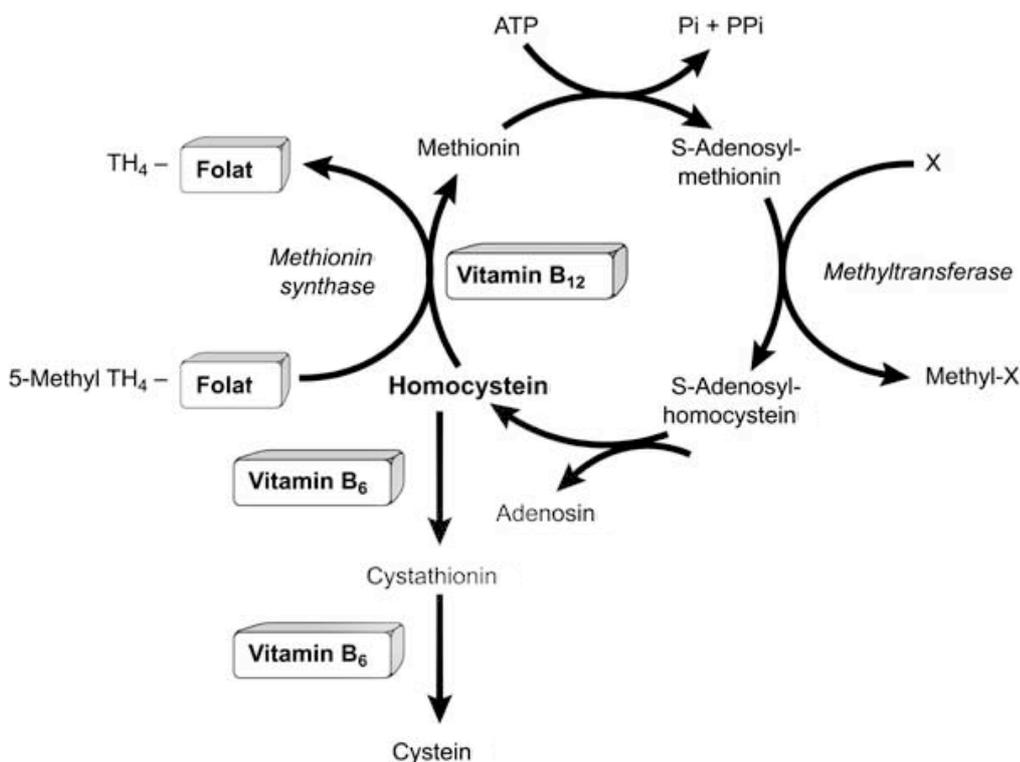


Abb. 4: Intrazellulärer Metabolismus des Homozysteins.

3. Gegenstand der Arbeit

Der *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) gehört zur Familie der *Kunitz*-Typ Inhibitoren und inhibiert den extrinsischen Weg der Blutgerinnung relativ schnell durch Bildung eines quaternären Komplexes mit Faktor Xa und dem FVIIa/TF-Komplex, indem der in diesem Komplex gebundene FXa nicht mehr für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Verfügung steht. Somit stellt der TFPI den zentralen Inhibitor des extrinsischen Weges der Blutgerinnung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine biochemische und pathophysiologische Charakterisierung sowohl des rekombinanten Wildtyp-TFPI als auch der rekombinanten [P151L]Mutante dieses Gerinnungsinhibitors erfolgen. Beide Proteine wurden hierfür zunächst in *High Five*-Insektenzellen rekombinant exprimiert. Anschließend sollten diese auf Unterschiede in ihrer inhibitorischen Wirkung wie auch in ihren Bindungseigenschaften an verschiedene physiologische Liganden wie *Tissue factor*, FVIIa, LDL, UFH, LMWH, CS A, CS C oder Lipoprotein(a) hin untersucht werden. Ergänzend sollte die inhibitorische Wirkung sowohl des rWT-TFPI als auch des r[P151L]TFPI auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT) untersucht und verglichen werden.

Des Weiteren sollten physiologische Funktionen des TFPI, die über die bereits bekannte regulatorische Wirkung im Rahmen der Hämostase hinausgehen, untersucht werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte der *Tissue factor pathway inhibitor* zum einen in humanen Reproduktionsflüssigkeiten (Seminalplasma und Follikelflüssigkeit) quantifiziert werden, um seine Rolle für die männliche Fertilität sowie die Follikelreifung zu untersuchen. Zum anderen sollte seine Bedeutung im Rahmen der Vorgänge bei Hyperhomozysteinämie (hHcy) charakterisiert werden.

Im Zusammenhang mit den regulatorischen Mechanismen, die auf das Endothel wirken und dadurch die TFPI-Expression *in vivo* beeinflussen, sollte am Beispiel von *Ea.hy 926*-Zellen *in vitro* untersucht werden, ob die bei therapeutischer Gabe von Heparin *in vivo* nachgewiesene prompte TFPI-Mobilisierung in den Blutkreislauf lediglich eine Freisetzung von der endothelialen Oberfläche sowie aus intrazellulären Speichern darstellt, oder ob ebenfalls die *de novo*-Synthese des TFPI aktiviert wird. Hierzu wurden die Zellen u.a. mit Heparin inkubiert und anschließend deren TFPI-mRNA Expression mittels *Real Time* PCR quantifiziert sowie Veränderungen der Zellproliferations- und Apoptoserate untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung und Expression des WT-TFPI und der [P151L]TFPI-Mutante

Zunächst wurde die cDNA des Gesamt-TFPI sowohl für den Wildtyp als auch für die [P151L]Mutante mittels PCR aus TFPI-DNA enthaltenden *pPicZ α A*-Derivaten amplifiziert und mit dem Vektor *pCR2.1* ligiert. Mit diesen Ligationsansätzen wurden anschließend *TOP10*-Zellen transformiert. Nach Überprüfung der Nukleotidsequenz der Inserts mittels Doppelstrangsequenzierung wurde die aus den entsprechenden Klonen isolierte Plasmid-DNA mit dem Vektor *pMIB/V5-His C* ligiert, um anschließend *High Five*-Zellen mit diesem zu transfizieren. Dieser Vektor eignet sich besonders gut zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen, da dieser das Melittin-Sekretionssignal (HBM) enthält, welches zur sekretorischen Expression der Proteine führt, außerdem sowohl den *Op/E1*- wie auch den *Op/E2*-Promotor. Diese bewirken zum einen die Expression des Blasticidin-Resistenzgens zum anderen führen sie zu einer verstärkten Expression des inserierten Gens. Die rekombinanten Proteine werden als Fusionsproteine mit sechs Histidin-Resten am Aminoterminus sowie einem V5-Epitop exprimiert, welche die Aufreinigung und Detektion erleichtern.

Die Expression des rekombinanten Wildtyp-TFPI und der [P151L]Mutante erfolgte dann sekretorisch in *High Five* Insektenzellen. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie neben einer relativ kurze Verdopplungszeit (<18 h), die Möglichkeit sowohl der adhärennten als auch der Suspensionskultivierung bietet und zudem eine serumfreie Kultivierung ermöglicht. (vgl. Diplomarbeit E. Thyzel „*Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI): Klonierung des Wildtyps und der [P151L]Mutante sowie deren rekombinante Darstellung in Insektenzellen“)

4.2. Immunologischer Nachweis des rWT-TFPI und r[P151L]TFPI

4.2.1. Quantitativer immunologischer TFPI-Nachweis

Die quantitative Bestimmung sowohl des rWT-TFPI als auch des r[P151L]TFPI im Zellkulturüberstand der *High Five*-Insektenzellen erfolgte mittels des *Imubind Total TFPI-ELISA*. Um eine konstitutive TFPI-Sekretion durch die verwendete Zelllinie auszuschließen, wurde zunächst der Zellkulturüberstand untransfizierter Zellen untersucht, in dem kein TFPI gefunden wurde. Ebenfalls untersucht wurde der Zellkulturüberstand von Zellen, welche mit dem Vektor *pMIB/V5 CAT* transfiziert worden waren. Auch hier konnte sowohl eine TFPI-Expression als auch eine Kreuzreaktivität oder unspezifische Reaktion mit den verwendeten Anti-TFPI-Antikörpern ausgeschlossen werden.

Im Zellkulturüberstand der mit WT-TFPI- bzw. [P151L]TFPI-cDNA transfizierten Zellen

hingegen konnten signifikante Mengen der rekombinanten Proteine detektiert werden. Die maximale Konzentration des rWildtyp-TFPI die im Zellkulturüberstand gemessen wurde betrug $215 \pm 12,6$ ng/mL. Die maximale Konzentration der [P151L]Mutante im Zellkulturüberstand lag bei $214 \pm 32,3$ ng/mL (Tab. 1).

Probenmaterial	TFPI-Konzentration [ng/mL]
rWT-TFPI	max. $215 \pm 12,6$
r[P151L]TFPI	max. $214 \pm 32,3$
<i>pMIB/V5 CAT</i>	-
Zellkulturüberstand	-

Tab. 1: TFPI-Konzentrationen im Zellkulturüberstand untransfizierter *High Five*-Zellen sowie im Zellkulturüberstand von Zellen, die mit den Expressionsvektoren für WT- und [P151L]TFPI bzw. dem Vektor *pMIB/V5 CAT* transfiziert wurden.

4.2.2. Quantitative Bestimmung der TFPI-Aktivität

Zur quantitativen Bestimmung der TFPI-Aktivität wurde mit dem *Actichrome* TFPI-Aktivitätstest, ein chromogener Assay verwendet, der die Quantifizierung von inhibitorisch aktivem TFPI sowohl in Citratplasma als auch in Zellkulturüberständen ermöglicht.

Durch Überprüfung von Zellkulturüberständen untransfizierter Zellen wie auch von Zellen, die mit dem Vektor *pMIB/V5 CAT* transfiziert worden waren, wurde sichergestellt daß keine konstitutive TFPI-Expression oder die eines Proteins mit TFPI-ähnlicher Wirkung stattfand. Im Test zeigte sowohl das rWT-TFPI als auch die r[P151L]Mutante eine deutliche inhibitorische Aktivität. Es hat also die Sekretion enzymatisch aktiver rekombinanter Proteine stattgefunden. Des weiteren zeigte die deutliche Zunahme der TFPI-Aktivität mit der Inkubationsdauer, daß eine kontinuierliche Expression der rekombinanten Proteine stattgefunden hat.

4.2.3. Immunologischer Nachweis mit Anti-V5-Antikörpern

Die Zellkulturüberstände der transfizierten *High Five*-Zellen wurden zunächst ca. 80fach aufkonzentriert, unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch *Electroblotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis sowohl des rWT-TFPI als auch des r[P151L]TFPI erfolgte mittels HRP-gekoppelter Anti-V5-Antikörper, die spezifisch an das V5-Epitop am C-terminalen Ende der rekombinanten Fusionsproteine binden.

Beide Zellkulturüberstände (rWT-TFPI & r[P151L]TFPI) zeigten jeweils eine einzelne Proteinbande der erwarteten Größe von ca. 41-43 kDa (Abb. 5).

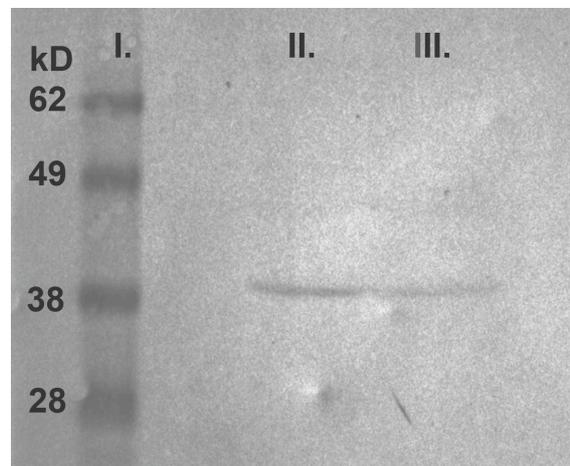


Abb. 5: Western Blot-Immundetektion des rWT-TFPI und r[P151L]TFPI. Beide rekombinanten Proteine wurden in *High Five* Insektenzellen exprimiert, die Zellkulturüberstände ca. 80fach aufkonzentriert und die rekombinanten Proteine anschließend einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. Die Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels eines Anti-V5-HRP monoklonalen Antikörpers detektiert.

Spur I: Proteinstandard

Spur II: rWT-TFPI-haltiger Zellkulturüberstand

Spur III: r[P151L]TFPI-haltiger Zellkulturüberstand

4.3. Charakterisierung des rekombinanten WT- und [P151L]TFPI

4.3.1. Untersuchung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Inhibitoren

Zur Charakterisierung der rekombinanten Proteine, sollte die Affinität des rWT-TFPI und r[P151L]TFPI zu verschiedenen physiologischen Liganden untersucht werden, die zuvor für 24 h bei Raumtemperatur an einer Polystyroloberfläche (Mikrotiterplatte) immobilisiert worden waren.

In einem ersten Schritt wurde die Abhängigkeit der TFPI-Bindung von der Konzentration des immobilisierten ersten Liganden getestet. Hierbei zeigte die Inkubation mit 80-fach aufkonzentriertem Zellkulturüberstand, welcher eine konstante Konzentration an rekombinatem TFPI enthält, eine klare Abhängigkeit der Absorption bei 490 nm von der Konzentration des immobilisierten Liganden, sowohl bei LDL (Tab. 2) als auch bei Lipoprotein(a) (Tab. 3).

Konzentration [mg/mL]	Absorption
400	0,115
200	0,119
100	0,119
40	0,119
20	0,117
10	0,114
4	0,090
2	0,071
1	0,050
0,4	0,050

Tab. 2: Absorption bei 490 nm nach Beschichtung der Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit LDL-Konzentrationen zwischen 0,4 und 400 mg/mL und anschließender Inkubation mit 80-fach aufkonzentriertem rTFPI-haltigem Zellkulturüberstand.

Der Nachweis des TFPI-V5-Fusionproteins erfolgte durch Detektion mittels eines HRP-gekoppelten Anti-V5-Antikörpers und anschließende Umsetzung einer OPD-Substratlösung.

Negativkontrolle (NaCl/P_i): A₄₉₀ = 0,033

Konzentration [mg/mL]	Absorption
40	0,174
20	0,143
10	0,142
4	0,132
2	0,1
1	0,077
0,4	0,055

Tab. 3: Absorption bei 490 nm nach Beschichtung der Kavitäten der Mikrotiterplatte mit Lp(a)-Konzentrationen zwischen 0,4 und 40 mg/mL und anschließender Inkubation mit 80-fach aufkonzentriertem rTFPI-haltigem Zellkulturüberstand.

Der Nachweis des TFPI-V5-Fusionproteins erfolgte durch Detektion mittels eines HRP-gekoppelten Anti-V5-Antikörpers und anschließende Umsetzung einer OPD-Substratlösung.

Negativkontrolle (NaCl/P_i): A₄₉₀ = 0,033

Um eine unspezifische Adsorption der rekombinanten Inhibitoren an die Kunststoffmatrix der verwendeten Mikrotiterplatten und etwaige dadurch bedingte erhöhte Absorptionswerte auszuschließen, wurden auch unbeschichtete sowie mit BSA in Konzentrationen von 0,4 bis 4000 mg/mL beschichtete Kavitäten getestet. Hierbei konnte keine signifikante Adsorption des WT- oder [P151L]TFPI festgestellt werden (Tab. 4). Des weiteren lieferte die Inkubation mit 80-fach aufkonzentriertem Zellkulturüberstand untransfizierter *High Five*-Insektenzellen keine Absorptionszunahme verglichen mit den nach Inkubation mit NaCl/P_i gemessenen Werten.

Konzentration [mg/mL]	Absorption
1000	0,035
400	0,033
200	0,033
100	0,032
40	0,035
4	0,035
0,4	0,034

Tab. 4: Absorption bei 490 nm nach Beschichtung der Kavitäten der Mikrotiterplatte mit BSA-Konzentrationen von 0,4 bis 4000 mg/mL und anschließender Inkubation mit 80-fach aufkonzentriertem rTFPI-haltigem Zellkulturüberstand.

Der Nachweis des TFPI-V5-Fusionproteins erfolgte durch Detektion mittels eines HRP-gekoppelten Anti-V5-Antikörpers und anschließende Umsetzung einer OPD-Substratlösung.

Negativkontrolle (NaCl/P_i): A₄₉₀ = 0,033

Ein Vergleich der Bindungseigenschaften von rWT- und r[P151L]TFPI an die physiologischen Liganden LDL, Lp(a), TF, VIIa, FXa, CS-A, CS-C, UFH und LMWH zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden rekombinanten Proteinen. Generell wurden für das rekombinante Wildtyp-Protein höhere Absorptionen detektiert als für die rekombinante [P151L]Mutante, was auf eine stärkere Affinität zu den untersuchten Liganden schließen läßt. Um die Absorptionen, die in verschiedenen Meßreihen sowie bei der Verwendung verschiedener Mikrotiterplatten und Liganden gemessen wurden vergleichen zu können, wurden nicht die detektierten Rohdaten verglichen sondern es wurde jeweils der Absorptionskoeffizient (Q) bestimmt. Hierzu wurde die Absorption jeder Probe durch die Absorption der jeweils zugehörigen Negativkontrolle (NaCl/P_i) dividiert. Für alle untersuchten Liganden differieren die Absorptionskoeffizienten (Q) für das rWT-TFPI signifikant von den für das r[P151L]TFPI ermittelten Werten (Tab. 5).

Die Charakterisierung des Bindungsverhaltens an die verschiedenen immobilisierten Liganden ergab, daß das r[P151L]TFPI grundsätzlich geringere absolute Absorptionen sowie einen kleineren Absorptionsquotienten (Q) zeigte. Die Bindung des rekombinanten TFPI an immobilisiertes Chondroitinsulfat A und C zeigte die höchsten absoluten Absorptionen sowie Absorptionsquotienten (Q). Während der Vergleich der Bindungseigenschaften an immobilisiertes unfraktioniertes Heparin (UFH) bzw. niedermolekulares Heparin (LMWH) für rWT-TFPI einen signifikanten Unterschied aufzeigte ($p = 0,001$), konnte ein analoger Effekt für die rekombinante [P151L]Mutante nicht festgestellt werden ($p = 0,053$). Bei Bindung an immobilisiertes Chondroitinsulfat A bzw. C zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen dem rekombinanten Wildtyp- und dem [P151L]-Protein ($p = 0,105$ bzw. $p = 0,145$; Tab. 5).

Ligand	MW (WT)	SD (WT)	MW ([P151L])	SD ([P151L])	<i>p</i>
LDL	1,23	0,06	1,33	0,03	0,049
Lp(a)	1,73	0,06	1,16	0,02	0,001
TF	1,80	0,08	1,16	0,19	0,006
FVIIa	1,92	0,06	1,12	1,17	0,002
Fxa	2,46	0,05	1,10	0,04	0,001
Chondroitinsulfat A	3,69	0,32	2,02	0,17	0,001
Chondroitinsulfat C	3,12	0,13	2,24	0,12	0,004
UFH	3,90	0,08	1,17	0,09	0,001
LMWH	4,18	0,05	1,29	0,03	0,001

Tab. 5: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und *p*-Werte der Absorptionsquotienten (Q), die für an die verschiedenen immobilisierten Liganden gebundenes rWT-TFPI sowie r[P151L]TFPI berechnet wurden.

Die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante wurden mit Hilfe des Student's *t*-Test analysiert und ein *p*-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Werte wurden in Dreifachmessungen bestimmt.

Negativkontrolle (NaCl/P_i): A₄₉₀ = 0,033

4.3.2. Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung der rekombinanten Inhibitoren auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT)

4.3.2.1. Wirkung des durch BSA-Zugabe bedingten Verdünnungseffekts auf die aPTT

Zunächst wurde die durch den Verdünnungseffekt bedingte Verlängerung der modifizierten Thromboplastinzeit (aPTT) untersucht, um sicherzustellen daß die Untersuchung der rekombinanten Inhibitoren mit Flüssigkeitsvolumina durchgeführt wird, die keine Verdünnungseffekte bewirken.

Hierzu wurden zunehmende Volumina des für die aPTT-Bestimmung verwendeten Poolplasmas durch eine BSA-Lösung ersetzt, deren Gesamtproteingehalt mit 6 mg/mL etwa dem Gesamtproteingehalt der zu untersuchenden 80-fach aufkonzentrierten *High Five*-Zellkulturüberstände entspricht und jeweils die aPTT bestimmt. Die BSA-Lösung wurde in der Art dem Poolplasma zugefügt, daß jeweils ein Volumen von 100 μL erreicht wurde, d.h. 0 μL + 100 μL , 5 μL + 95 μL , 10 μL + 90 μL , usw.

Diese Flüssigkeitszugabe führte zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Verlängerung der aPTT. Während die Zugabe von 5 μL BSA-Lösung zu 95 μL Poolplasma noch zu keiner signifikanten Verlängerung der aPTT führte, zeigte sich bereits nach Zugabe von 10 μL BSA-Lösung zu 90 μL Poolplasma ein signifikanter Effekt (Abb. 6).

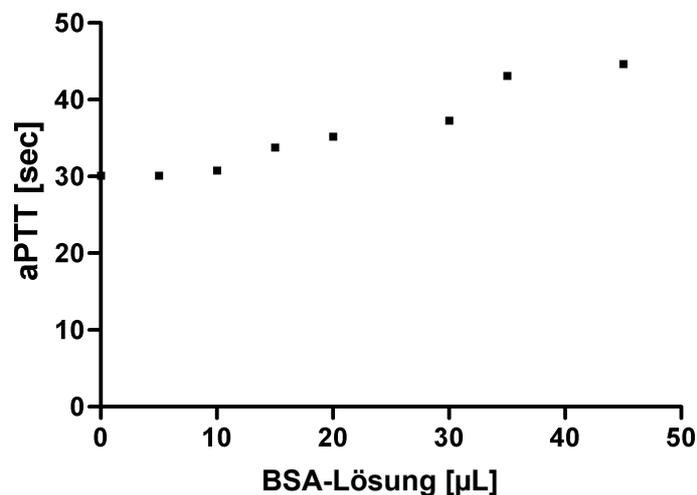


Abb. 6: Modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT) nach Zugabe zunehmender Volumina einer BSA-Lösung (6 mg/mL) zum Poolplasma. Eine konzentrationsabhängige Verlängerung der aPTT mit zunehmendem BSA-Volumen ist deutlich erkennbar.

4.3.2.2. Quantifizierung der durch die rekombinanten Inhibitoren bewirkten aPTT-Verlängerung

Ergänzend zu den Messungen mittels des *Actichrome* TFPI-Tests wurde die inhibitorische Wirkung beider rekombinanter Inhibitoren durch die Bestimmung ihres Einflusses auf die aPTT charakterisiert. Während die Zugabe von 5 μ L H₂O, einer BSA-Lösung (6 mg/mL) oder eines 80-fach aufkonzentrierten Zellkulturüberstandes untransfizierter *High Five*-Zellen zum Poolplasma zu keiner signifikanten Änderung der aPTT führte, bewirkte die Zugabe rTFPI-haltigen Zellkulturüberstands eine signifikante Verlängerung der aPTT (Abb. 7).

Die Messung der aPTT nach Zugabe von 5 μ L eines 80-fach aufkonzentrierten *High Five*-Zellkulturüberstands, der entweder rWT-TFPI oder r[P151L]TFPI enthielt, zeigte eine statistisch signifikante und konzentrationsabhängige aPTT-Verlängerung. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von rWT-TFPI und r[P151L]TFPI auf die aPTT konnte nicht festgestellt werden (Abb. 7).

Nach Zugabe von 5 μ L eines 80-fach aufkonzentrierten Zellkulturüberstandes untransfizierter *High Five*-Zellen zum Poolplasma wurde eine aPTT von $33,5 \pm 0,11$ sec ($n = 16$) gemessen. Im Vergleich dazu erhöhte sich die aPTT auf $36,7 \pm 0,20$ sec nach Zugabe von 5 μ L eines 0,72 ng rWT-TFPI enthaltenden Zellkulturüberstandes bzw. auf $37,4 \pm 0,50$ sec ($n = 21$) nachdem 5 μ L eines 0,72 ng r[P151L]TFPI enthaltenden Zellkulturüberstandes zugefügt worden waren (Abb. 7).

Wie erwartet führte die Zugabe von 5 μ L Zellkulturüberstand, der mit 1,43 ng die doppelte Menge an rekombinantem TFPI enthielt zu einer weiteren Verlängerung der aPTT. Für rWT-TFPI wurden hier $42,9 \pm 0,26$ sec ($n = 8$) gemessen, für r[P151L]TFPI lag der entsprechende Wert bei $42,2 \pm 0,33$ sec ($n = 7$) (Abb. 3).

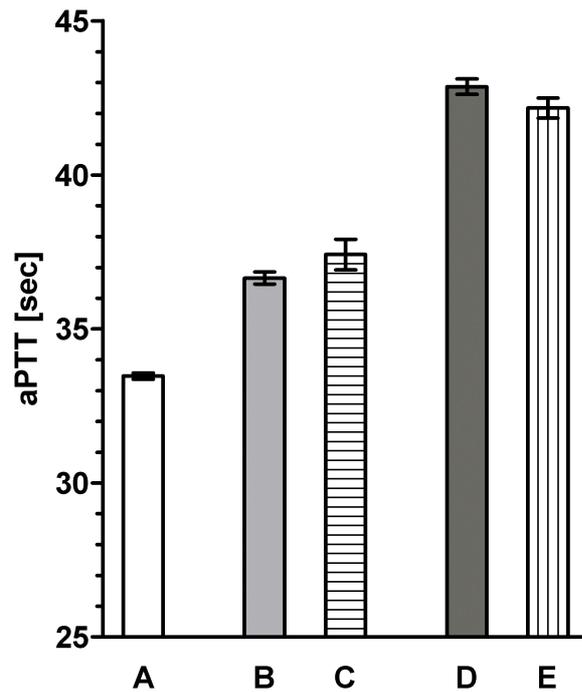


Abb. 7: aPTT-Verlängerung nach Zugabe von 80-fach aufkonzentriertem Zellkulturüberstand (*High Five*-Insektenzellen) mit einem Gehalt von 0; 0,72 bzw. 1,43 ng rTFPI zum Poolplasma. (Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen SEM multipler Messungen.)

A: Zellkulturüberstand untransfizierter Zellen (n = 16)

B: Zellkulturüberstand mit 0,72 ng rWT-TFPI (n = 28)

C: Zellkulturüberstand mit 0,72 ng r[P151L]TFPI (n = 21)

D: Zellkulturüberstand mit 1,43 ng rWT-TFPI (n = 8)

E: Zellkulturüberstand mit 1,43 ng r[P151L]TFPI (n = 7)

4.4. TFPI-Quantifizierung in humanen Reproduktionsflüssigkeiten

4.4.1. Bestimmung der TFPI-Konzentration in humanem Seminalplasma

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmalig der Nachweis signifikanter Konzentrationen von TFPI in humanem Seminalplasma.

Die quantitative TFPI-Bestimmung in den verschiedenen Partitionen fraktionierten Seminalplasmas ergab deutliche Konzentrationsunterschiede. Während in der ersten Fraktion, die vor allem von den Cowperschen Drüsen sekretiert wird, 7,5 ng/mL TFPI gemessen wurden, lag die TFPI-Konzentration in der zweiten und dritten Fraktion (Prostata) lediglich bei etwa 2 ng/mL, in der vierten und fünften Fraktion (Hoden) bei ca. 3 ng/mL und in der sechsten Fraktion (*vesicula seminalis*) deutlich unter 1 ng/mL.

4.4.1.1. TFPI-Konzentration im Seminalplasma gesunder Samenspender

Die quantitative Bestimmung der Gesamt-TFPI Konzentration mittels des *Imubind Total TFPI-ELISA* im Seminalplasma 28 gesunder Samenspender ergab eine Konzentration von $3,55 \pm 2,42$ ng/mL (Median \pm SD) mit einem 90%-Bereich zwischen 0,93 und 7,90 ng/mL (Abb. 13). Damit ist die Konzentration dieses Gerinnungsinhibitors im Seminalplasma etwa um den Faktor 20 niedriger als im Serum (Median: 60,4 ng/mL; 90%-Bereich: 20,8 – 151,3 ng/mL).

4.4.1.2. TFPI-Konzentration im Seminalplasma infertiler Männer

Die Untersuchung der Seminalplasmaproben 23 infertiler Männer, die entweder unter Oligozoo-, Teratozoo- oder Asthenozoospermie (OTA) litten, ergab eine Gesamt-TFPI Konzentration von lediglich $2,20 \pm 2,03$ ng/mL (Median \pm SD) mit einem 90%-Bereich von 0,28 bis 6,03 ng/mL (Abb. 13). Im Gegensatz zur TFPI-Konzentration waren die anderen untersuchten Parameter, wie pH-Wert und Leukozytenkonzentration, im Normalbereich.

4.4.1.3. Vergleich der TFPI-Konzentration im Seminalplasma fertiler und infertiler Männer

Es konnten erstmals signifikante Mengen an TFPI in humanem Seminalplasma nachweisen werden, wobei die Gesamt-TFPI Konzentration im Seminalplasma nur etwa 5 % der

Plasmakonzentration beträgt. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die TFPI-Konzentration im Seminalplasma infertiler Männer im Vergleich zu gesunden Samenspendern signifikant erniedrigt ist ($p < 0,07$; Abb. 8).

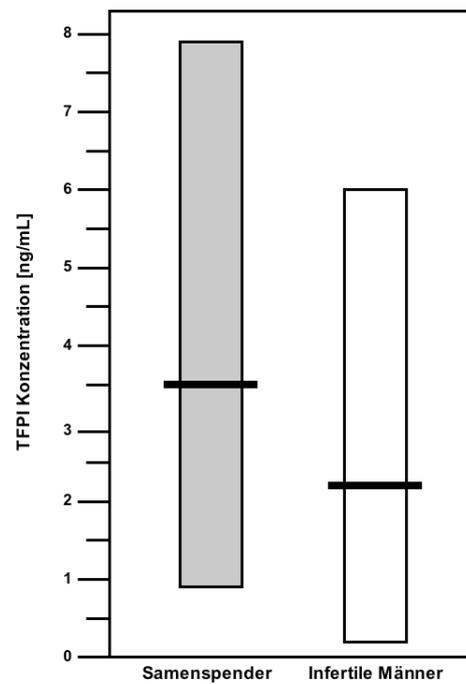


Abb. 8: Gesamt-TFPI Konzentration im Seminalplasma von Samenspendern (n=28, grauer Balken) und infertilen Männern (Oligozoo-, Asthenozoo- oder Teratozoospermie; n=23, weißer Balken). Es sind die 90%-Bereiche und die Mediane dargestellt.

4.4.2. TFPI-Quantifizierung in humaner ovarieller Follikelflüssigkeit

Die quantitative Bestimmung der Gesamt-TFPI Konzentration in ovarieller Follikelflüssigkeit (hFF) von Frauen, die sich einer IVF (*in vitro Fertilisation* / künstliche Befruchtung) unterziehen, ergab Konzentrationen, die weit über den Werten liegen, die im Plasma gefunden werden. Der Median der TFPI Konzentration in der Follikularflüssigkeit wurde mit 298 ± 158 ng/mL bestimmt, wobei der 90%-Bereich von 109 bis 648 mg/mL ($n=70$) reichte. Die in der Follikelflüssigkeit gefundenen TFPI-Konzentrationen waren somit ca. um den Faktor fünf höher als die entsprechenden Konzentrationen im Blut.

Im Gegensatz zur TFPI-Konzentration lag die in der Follikelflüssigkeit bestimmte Gesamtproteinkonzentration mit $45,5 \pm 14,7$ mg/mL im gleichen Bereich wie die im Plasma gemessenen Werte (35,0 – 55,0 mg/mL).

4.4.2.1 Altersabhängigkeit der TFPI-Konzentration in der Follikelflüssigkeit

Die Korrelation der in der ovariellen Follikelflüssigkeit gemessenen Gesamt-TFPI Konzentrationen mit dem Alter der Patientinnen ergab eine signifikante, positive Altersabhängigkeit ($n=28$; $r^2=0,199$). So wies die Follikularflüssigkeit 40jähriger Patientinnen im Mittel etwa doppelt so hohe TFPI-Konzentrationen auf wie diejenige von 25jährigen Patientinnen (Abb. 9).

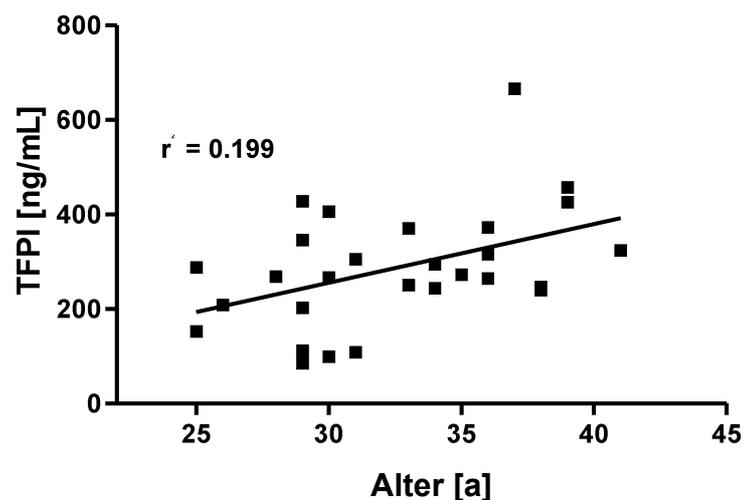


Abb. 9: TFPI-Konzentration in humaner ovarieller Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen. ($n=28$; $r^2=0,199$)

4.4.2.2. Vergleich von OHSS- und Nicht-OHSS-Patientinnen

Der Vergleich der Serum E₂-Konzentration, der Anzahl der Oozyten, der Gesamtproteinkonzentration sowie des Alters der Patientinnen in der hFF ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Frauen, die im Verlauf der IVF ein OHSS entwickelt hatten (n = 6) und Nicht-OHSS-Patientinnen (n = 22). Obwohl die mittlere in der hFF der OHSS-Patientinnen bestimmte TFPI Konzentration mit 323 ± 66,8 ng/mL höher war als die bei Frauen, die keine Symptome eines OHSS zeigten (279 ± 137), erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant (p = 0,45; Tab. 6).

Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Follikelzahl nachgewiesen werden, die bei OHSS mit 12,3 ± 2,42 größer war als symptomfreien IVF-Patientinnen mit 9,36 ± 2,85 (p < 0,03, Tab. 6). Auch die Schwangerschaftsrate erwies sich mit 50 % bei den OHSS-Patientinnen als deutlich höher im Vergleich zu 32 % bei den anderen Frauen (Tab. 6).

Parameter	OHSS	Nicht-OHSS	p
Alter [a]	33,0 ± 4,60	32,4 ± 4,56	ns
TFPI in hFF [ng/mL]	323 ± 66,8	279 ± 137	ns
E ₂ bei hCG-Gabe [pg/mL]	1613 ± 855	1445 ± 1138	ns
Follikel [n]	12,3 ± 2,42	9,36 ± 2,85	< 0,03
Oozyten [n]	12,8 ± 4,07	8,77 ± 5,81	ns
Protein in hFF [g/L]	59,9 ± 7,55	63,7 ± 15,1	ns
Schwangerschaften [n]	3 (50 %)	7 (32 %)	-

Tab. 6: Vergleich zwischen Frauen, die im Rahmen der IVF ein OHSS entwickelt haben (n = 6) und Frauen ohne Anzeichen für diese Erkrankung (n = 22).

Es sind jeweils Mittelwerte ± SD angegeben. E₂ = 17-β-Östradiol; ns = nicht signifikant

4.4.2.3. Untersuchung klinisch-chemischer Parameter, die den Erfolg einer IVF beeinflussen

Ein Vergleich der TFPI-Konzentration in der Follikelflüssigkeit, der Zahl der Oozyten, der Gesamtproteinkonzentration in der hFF wie auch der Anzahl der Follikel zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen, die im Verlauf der IVF schwanger wurden ($n = 10$) und Frauen bei denen ein Erfolg der IVF ausblieb ($n = 18$; Tab. 7).

Die Serum- E_2 -Konzentration am Tag der hCG-Gabe war bei den Frauen, bei denen es später zu einer Schwangerschaft kam mit 1881 ± 1559 pg/mL zwar deutlich höher als bei den Frauen, bei denen die Behandlung erfolglos blieb (1325 ± 631). Dieser Unterschied erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p = 0,19$; Tab. 7).

Parameter	Schwangerschaft	keine Schwangerschaft	p
Alter [a]	$30,5 \pm 4,48$	$33,6 \pm 4,22$	ns
TFPI in hFF [ng/mL]	263 ± 120	300 ± 130	ns
E_2 bei hCG-Gabe [pg/mL]	1881 ± 1559	1325 ± 631	ns
Follikel [n]	$11,3 \pm 2,54$	$9,28 \pm 3,05$	ns
Oozyten [n]	$10,6 \pm 4,88$	$9,28 \pm 6,04$	ns
Protein in hFF [g/L]	$61,4 \pm 10,2$	$59,4 \pm 17,7$	ns

Tab. 7: Vergleich zwischen Patientinnen, die im Verlaufe der IVF schwanger wurden ($n = 10$) und nicht-schwangeren IVF-Patientinnen ($n = 18$).

Es sind jeweils Mittelwerte \pm SD angegeben. $E_2 = 17\text{-}\beta\text{-Östradiol}$; ns = nicht signifikant

4.5. TFPI und Hyperhomozysteinämie

4.5.1 Klinisch-chemische Parameter

Die Untersuchung von 82 (männlich: 61; weiblich 21) hyperhomozysteinämischen Patienten (hHcy; Hcy > 15 µmol/L) zeigte bei diesen eine Serum-Homozysteinkonzentration von $21,9 \pm 6,45$ µmol/L, während diese in der Kontrollgruppe von 78 (männlich: 47; weiblich 31) Blutspendern bei lediglich $10,7 \pm 1,79$ µmol/L lag. Die mittlere TFPI-Konzentration war bei den hHcy-Patienten mit $71,0 \pm 26,4$ ng/mL statistisch signifikant erhöht gegenüber Blutspendern mit $59,3 \pm 18,9$ ($p = 0,003$). Bei weiblichen hHcy-Patienten war dieser Effekt dabei wesentlich deutlicher ausgeprägt ($76,5 \pm 26,8$ ng/mL vs. $52,2 \pm 17,1$; $p < 0,001$) als bei den männlichen Patienten. Bei diesen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der TFPI-Konzentration im Blut verglichen mit den männlichen Blutspendern festgestellt werden ($69,0 \pm 26,2$ ng/mL vs. $64,0 \pm 18,9$; $p = 0,31$; Tab. 8).

Während die Bestimmung der Trijodthyroninkonzentration (T_3) in Serumproben der hHcy-Patienten im Vergleich zu Blutspendern signifikant erniedrigte Konzentrationen aufzeigte ($0,78 \pm 0,20$ µg/L vs. $0,90 \pm 0,19$; $p < 0,001$), war die Konzentration des freien Thyroxins (fT_4) im Blut der hHcy-Patienten statistisch signifikant höher als im Kontrollkollektiv der Blutspender ($1,11 \pm 0,32$ ng/dL vs. $0,99 \pm 0,12$; $p < 0,006$). Die Untersuchung der Thyreotropinlevel (TSH) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,85$; Tab. 8).

Auch die quantitative Bestimmung der Triglyzerid-Konzentrationen sowohl bei den hyperhomozysteinämischen Patienten als auch bei den Blutspendern zeigte statistisch signifikante Unterschiede auf. So zeigten die hHcy-Patienten höhere Triglyzerid-Konzentrationen ($152 \pm 86,7$ mg/dL vs. $122 \pm 67,3$; $p < 0,02$) und, ähnlich wie beim TFPI, war auch hier der Effekt bei weiblichen Patienten ausgeprägter als bei männlichen. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Gesamtcholesterin-, LDL- und HDL-Level keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe auf (Tab. 8).

	hHcy-Patienten					Blutspender					p*
	n	min.	max.	MW	S.D.	n	min.	max.	MW	S.D.	
Alter [Jahre]	82	20,0	88,0	63,4	12,4	78	18,0	76,0	40,3	18,4	< 0,0001
Alter (Männer)	61	42,0	88,0	64,0	10,5	48	18,0	76,0	42,9	19,8	< 0,0001
Alter (Frauen)	21	20,0	77,0	61,5	16,9	30	19,0	71,0	35,5	14,4	< 0,0001
Hcy [µmol/L]	82	18,3	50,0	21,9	6,45	78	6,63	14,9	10,7	1,79	< 0,0001
Hcy (Männer)	61	15,0	38,1	22,0	5,79	48	6,70	14,9	10,9	1,74	< 0,0001
Hcy (Frauen)	21	15,4	50,0	21,7	8,23	30	6,63	14,6	10,4	1,86	< 0,0001
tTFPI [ng/mL]	75	29,1	139	71,0	26,4	68	21,4	109	59,3	18,9	< 0,004
tTFPI (Männer)	55	29,1	139	69,0	26,2	41	26,9	109	64,0	18,9	ns
tTFPI (Frauen)	20	41,3	135	76,5	26,8	27	21,4	83,9	52,2	17,1	< 0,001
T₃ [µg/L]	64	0,40	1,30	0,78	0,20	70	0,48	1,40	0,90	0,19	< 0,001
T ₃ (Männer)	49	0,40	1,30	0,78	0,21	41	0,48	1,30	0,88	0,18	< 0,02
T ₃ (Frauen)	15	0,50	1,00	0,79	0,17	29	0,66	1,40	0,92	0,21	< 0,04
fT₄ [ng/dL]	64	0,50	3,20	1,11	0,32	70	0,73	1,40	0,99	0,12	< 0,006
fT ₄ (Männer)	49	0,50	3,20	1,12	0,36	41	0,73	1,40	1,00	0,13	< 0,04
fT ₄ (Frauen)	15	0,90	1,30	1,06	0,12	29	0,83	1,21	0,99	0,10	< 0,05
TSH [mU/L]	59	0,05	4,72	1,22	0,87	75	0,09	4,20	1,24	0,70	ns
TSH (Männer)	43	0,05	7,50	1,16	0,83	46	0,51	4,20	1,34	0,73	ns
TSH (Frauen)	16	0,30	3,64	1,37	0,99	29	0,09	2,70	1,09	0,64	ns
Triglyzeride [mg/dL]	79	42,0	390	152	86,7	77	36,0	306	122	67,3	< 0,02
Trigl. (Männer)	60	42,0	390	152	84,6	47	40,0	306	133	70,4	ns
Trigl. (Frauen)	19	58,0	376	155	95,2	30	36,0	255	104	59,2	< 0,03
Cholesterin [mg/dL]	81	80,0	391	182	54,1	77	96,0	335	195	40,0	ns
Chol. (Männer)	60	80,0	391	182	58,8	47	136	335	198	40,2	ns
Chol. (Frauen)	21	112	261	183	38,5	30	96,0	252	191	40,0	ns

LDL [mg/dL]	80	47,0	253	116	39,2	77	66,0	230	121	30,8	ns	
LDL (Männer)	61	47,0	253	117	42,2	47	71,0	230	121	31,8	ns	
LDL (Frauen)	19	65,0	175	114	28,1	30	66,0	174	121	29,8	ns	
HDL [mg/dL]	80	21,0	95,0	47,6	15,6	77	21,0	83,0	51,0	12,0	ns	
HDL (Männer)	61	21,0	95,0	46,6	16,0	47	31,0	83,0	51,0	11,5	ns	
HDL (Frauen)	19	26,0	77,0	50,8	14,1	30	21,0	78,0	51,1	13,0	ns	
Geschlecht					%	n					%	n
	Männer:				74	61	Männer:				60	47
	Frauen:				26	21	Frauen:				40	31

Tab. 8: Klinische Parameter der Hyperhomozysteinämie-Patienten (hHcy) bzw. der Blutspender (Kontrollgruppe). * = Student's *t*-test; ein *p*-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. ns = nicht signifikant

4.5.2. Untersuchung der hHcy-Patienten und Blutspender auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin

Ein Vergleich dieser klinisch-chemischen Parameter zwischen männlichen und weiblichen Hyperhomozysteinämie-Patienten auf der einen und männlichen bzw. weiblichen Blutspendern auf der anderen Seite zeigte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, mit Ausnahme der TFPI-Konzentrationen bei Blutspendern. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der TFPI-Plasmakonzentration bei den männlichen Spendern im Vergleich zu Frauen (64.0 ± 18.9 ng/mL vs. 52.2 ± 17.1 ; $p = 0.011$; Tab.9).

	hHcy-Patienten	Blutspender
	(Männer vs. Frauen)	(Männer vs. Frauen)
Hcy	0,84	0,24
tTFPI	0,28	0,01
T3	0,93	0,39
fT4	0,51	0,76
TSH	0,84	0,13
Triglyzeride	0,23	0,07
Cholesterin	0,97	0,47
LDL	0,73	0,93
HDL	0,31	0,98

Tab. 9: Statistische Analyse der geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den Hyperhomozysteinämie-Patienten (hHcy) bzw. den Blutspendern (Kontrollgruppe). Angegeben sind die mittels des Student's *t*-test bestimmten *p*-Werte. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4.6. Untersuchungen zur Glykosaminoglykan-induzierten TFPI-mRNA Expression in *Ea.hy* 926- und *SW 1353*-Zellen

4.6.1. Etablierung einer *Real-Time* PCR-Methode zur Quantifizierung der TFPI-Genexpression

Nach der Auswahl sequenzspezifischer Primer wurde eine *Real-Time* PCR am *LightCycler*-System etabliert und optimiert, um abschließend eine relative Quantifizierung der TFPI-Genexpression in *Ea.hy* 926- sowie *SW 1353*-Zellen durchführen zu können.

Um quantitative Analysen am *LightCycler* durchführen zu können, wurden für das Zielgen (TFPI) verschiedene Verdünnungsreihen aufgenommen (Abb. 6). Mit Hilfe der *LightCycler*-Software wurden die gemessenen C_p -Werte (engl. *crossing point*) mit den jeweiligen Verdünnungsstufen korreliert und in Standardfunktionen umgerechnet. Dabei stellen die C_p -Werte den Zeitpunkt (Zyklusanzahl) dar, bei dem sich die Amplifikation des PCR-Produktes in einer exponentiellen Phase befindet und das Fluoreszenz-Grundsignal überschritten wird (Abb. 10).

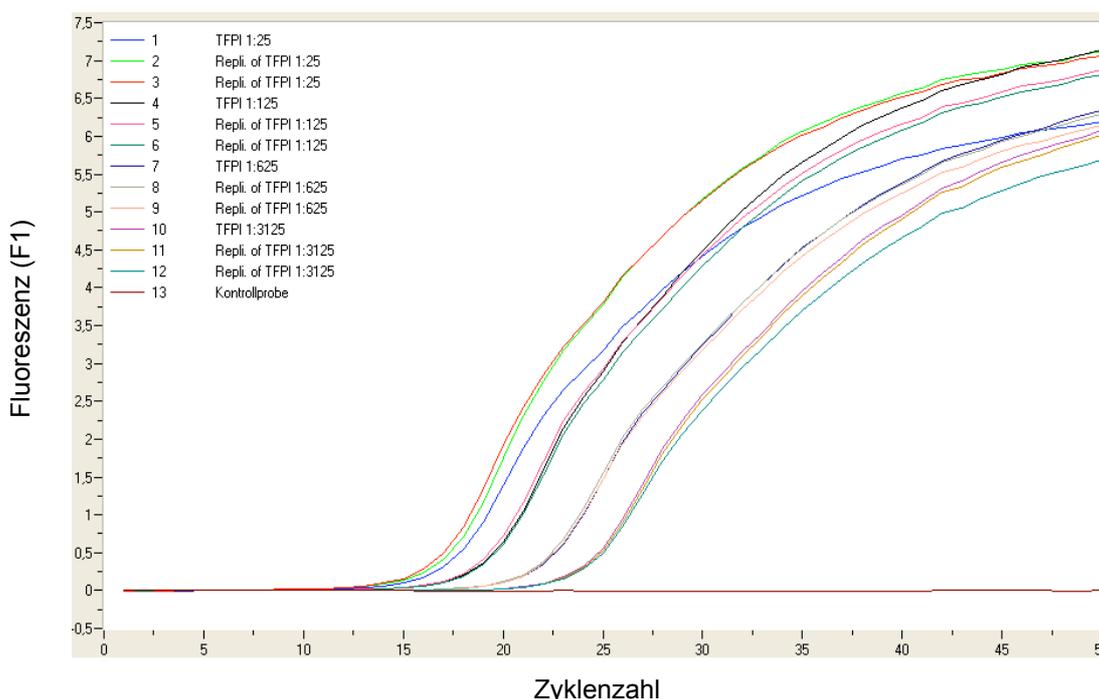


Abb. 10 Standardverdünnungsreihe mit dem TFPI-spezifischen Primer-Paar 1_5 und *Ea.hy* 926-cDNA bei 58°C *Annealing*-Temperatur und 15 sec Elongations- und *Annealing*-Zeit.

Probe 1-18: 5er Verdünnungsstufen der cDNA (je dreifach)

Probe 13: Kontrolle ohne *Template*

Anschließend wurden die am besten geeigneten Primerpaare anhand ihrer zuvor berechneten Effizienzen ausgewählt.

Um eine relative Quantifizierung der TFPI-mRNA expression durchführen zu können, wurde dann für jedes Zelllinie-Effektor-Paar ein konstant exprimiertes Haushaltsgen ermittelt.

Folgende Haushaltsgene wurden ausgewählt:

- *SW 1353*-Zellen: β_2 -Mikroglobulin (β_2 M)

- *Ea.hy 926*-Zellen: Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)
→ für die Effektoren LMWH, Chondroitinsulfat und Homozystein
Ubiquitin (Ubi)
→ für den Effektor UFH
 β_2 -Mikroglobulin (β_2 M)
→ für den Effektor Heparansulfat

4.6.2. Stimulation von *Ea.hy* 926-Zellen mit LMWH

Die Inkubation von *Ea.hy* 926-Zellen mit LMWH in einer Konzentration von 1 U/mL für eine Dauer von 4; 8 bzw. 24 Stunden führte zu einer geringfügigen Abnahme der TFPI-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während der Zusatz von 10 U/mL LMWH nach 4 h zunächst zu einer Vervielfachung der TFPI-Expression führte. Dieser Effekt war nach 8 h bereits deutlich zurückgegangen und nach 24 h betrug die Erhöhung der Expressionsrate lediglich noch etwa 20 % (Abb. 11).

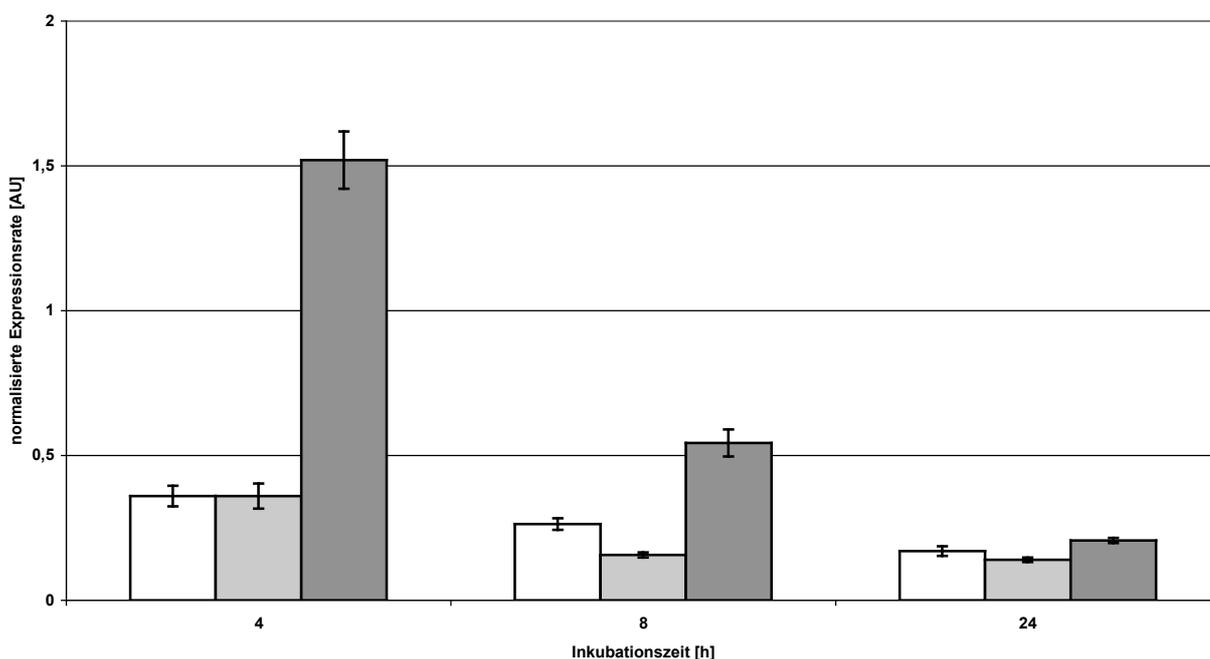


Abb. 11: Normalisierte Expressionsrate der TFPI-mRNA [AU] in *Ea.hy* 926-Zellen nach Inkubation mit 1 U/mL (hellgraue Säulen), 10 U/mL (dunkelgraue Säulen) bzw. ohne LMWH (weiße Säulen) für 4; 8 und 24 Stunden. Die vertikalen Balken kennzeichnen die Standardabweichung (SD).

4.6.3. Stimulation von *Ea.hy* 926-Zellen mit UFH

Nach Inkubation der *Ea.hy* 926-Zellen mit 1 U/mL UFH war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine geringfügige Zunahme der TFPI-Expression nach 4 h zu beobachten. Diese war nach 8 h auf den Faktor Faktor 2,7 angestiegen und nach 24 h bestand noch immer eine Verdopplung.

Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei Stimulation der Endothelzellen mit der zehnfachen Menge an UFH eine Verdopplung der TFPI-Expression nach 4 h, die auch nach weiteren 4 h persistierte. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h war die TFPI-Expression jedoch wieder auf den Level der unbehandelten Proben zurück gefallen (Abb. 12).

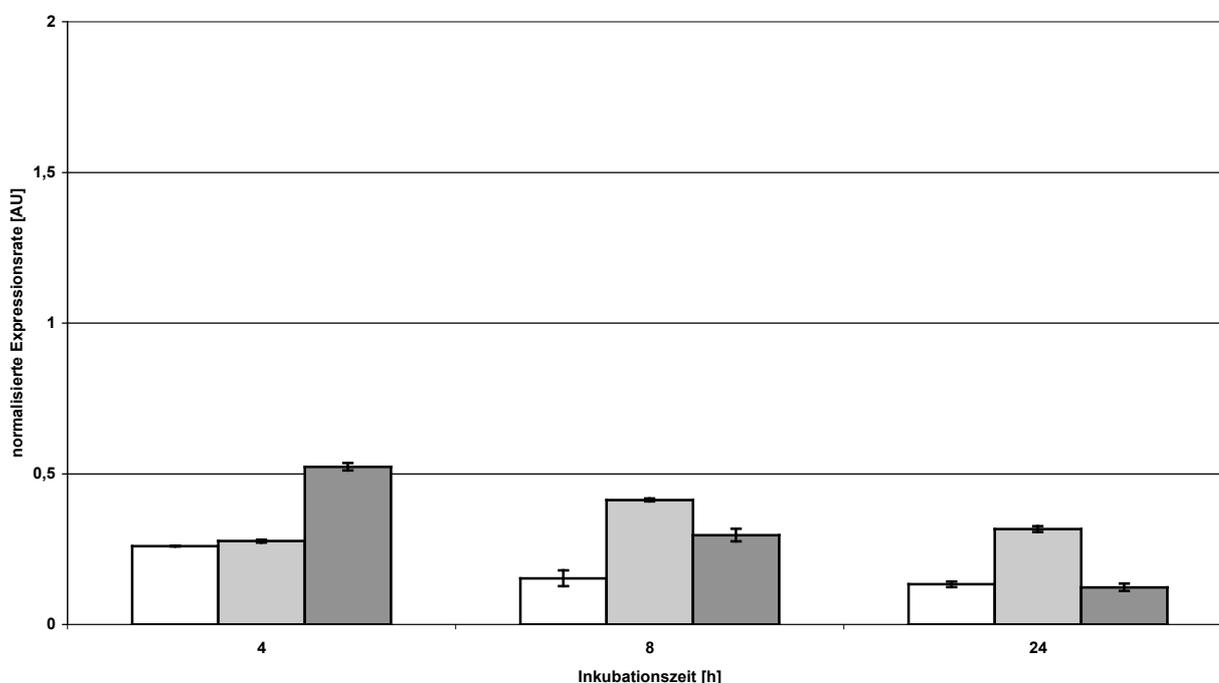


Abb. 12: Normalisierte Expressionsrate der TFPI-mRNA [AU] in *Ea.hy* 926-Zellen nach Inkubation mit 1 U/mL (hellgraue Säulen), 10 U/mL (dunkelgraue Säulen) bzw. ohne UFH (weiße Säulen) für 4; 8 und 24 Stunden. Die vertikalen Balken kennzeichnen die Standardabweichung (SD).

4.6.4. Stimulation von *Ea.hy* 926-Zellen mit Heparansulfat

Die Inkubation von *Ea.hy* 926-Zellen mit 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Heparansulfat (HS) als Effektor führte nach 4 h zu einer Abnahme der TFPI-Expression um etwa 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe. Dieser Effekt dauerte auch nach 8 h und 24h Inkubation an, wobei er sich jedoch nach 24 h deutlich abgeschwächt hatte.

Auch die Stimulation der Endothelzellen mit einer um den Faktor 10 höheren Heparansulfatkonzentration (62,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zeigte eine vergleichbare Wirkung wie die Verwendung von 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, jedoch mit einem gegenüber der unbehandelten Kontrolle noch stärkeren Rückgang der TFPI-Expression nach einer Inkubationsdauer von 24 h (Abb. 13).

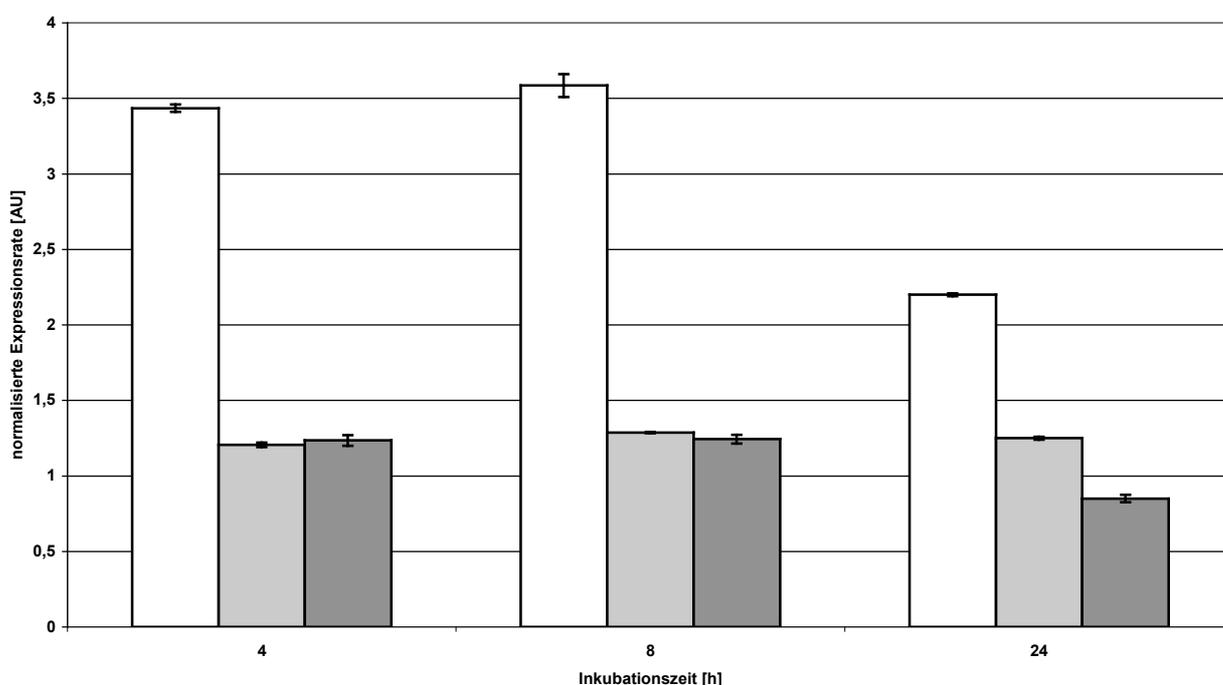


Abb. 13: Normalisierte Expressionsrate der TFPI-mRNA [AU] in *Ea.hy* 926-Zellen nach Inkubation mit 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hellgraue Säulen), 62,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dunkelgraue Säulen) bzw. ohne Heparansulfat (HS) (weiße Säulen) für 4; 8 und 24 Stunden. Die vertikalen Balken kennzeichnen die Standardabweichung (SD).

4.6.5. Stimulation von *Ea.hy* 926-Zellen mit Chondroitinsulfat

Die *in vitro*-Stimulation von *Ea.hy* 926-Zellen mit 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chondroitinsulfat für 4 h sowie 8 h führte zu einer, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, um ca. 20 % verringerten TFPI-Expressionsrate. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h hatte sich die Expressionsminderung auf etwa 35 % erhöht.

Im Gegensatz dazu bewirkte die Behandlung der Zellen mit 62,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chondroitinsulfat keine signifikante Änderung der TFPI-Expressionsrate nach 4 h Inkubationsdauer. Nach 8 h war der Effekt vergleichbar mit dem, den die mit 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chondroitinsulfat behandelten Zellen zeigten, und dieser hielt auch nach insgesamt 24 h Inkubation an (Abb. 14).

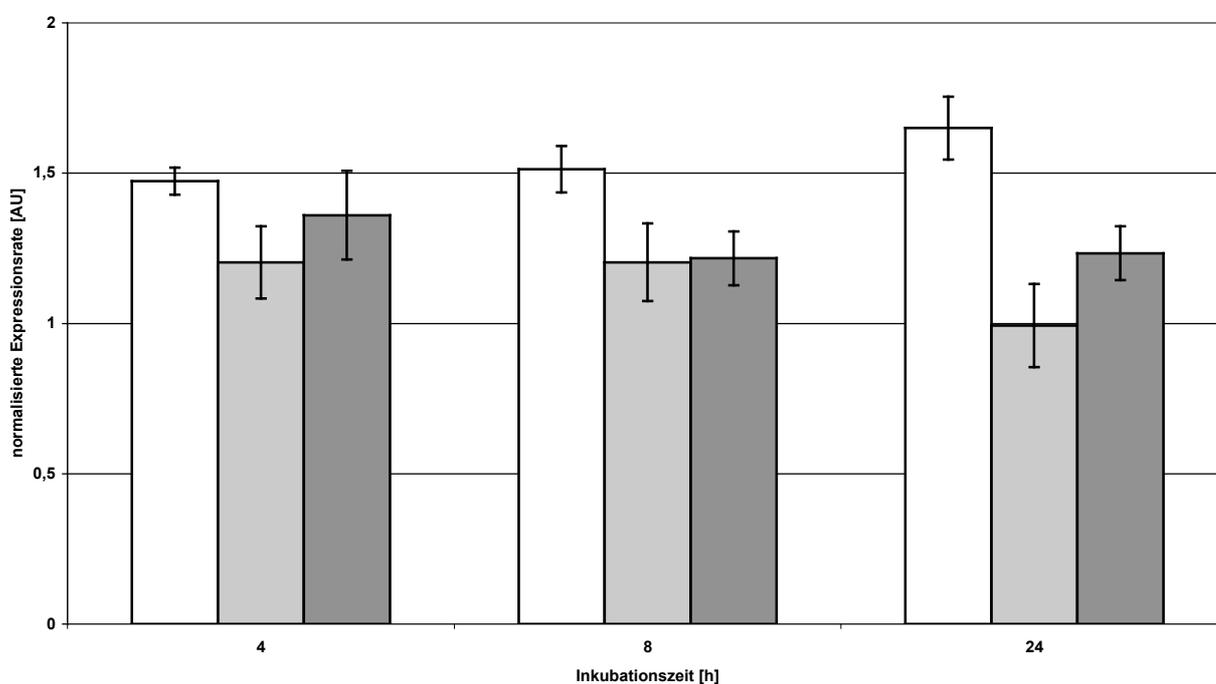


Abb. 14: Normalisierte Expressionsrate der TFPI-mRNA [AU] in *Ea.hy* 926-Zellen nach Inkubation mit 6,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hellgraue Säulen), 62,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dunkelgraue Säulen) bzw. ohne Chondroitinsulfat (CS) (weiße Säulen) für 4; 8 und 24 Stunden. Die vertikalen Balken kennzeichnen die Standardabweichung (SD).

4.6.6. Inkubation von *SW* 1353-Zellen mit Chondroitinsulfat

Bei den untersuchten *SW* 1353-Zellen zeigte sich weder nach 4 h, noch nach 8 h oder nach 24 h Inkubation mit LMWH, UFH, Heparansulfat oder Chondroitinsulfat ein signifikanter Effekt auf die TFPI-mRNA Expression.

4.7. Wirkung von Homozystein auf Zellproliferation und Apoptose von *Ea.hy 926*- sowie *SW 1353*-Zellen

Zur Aufklärung der Wirkung von Homozystein (Hcy) auf eukaryotische Zellen, vor allem auch in höherer als der physiologisch auftretenden Konzentration, wurde dessen Einfluß auf die Zellproliferation sowie eine mögliche Apoptoseinduktion bei *Ea.hy 926*- und *SW 1353*-Zellen untersucht. Die Zellen wurden hierzu für 24 Stunden mit Homozystein in folgenden Konzentrationen inkubiert:

- 1.) 1 µmol/L Hcy ($\approx 1/10$ der physiologischen Konzentration)
- 2.) 10 µmol/L Hcy (\approx physiologische Konzentration)
- 3.) 100 µmol/L Hcy ($\approx 10 \times$ physiologische Konzentration)

4.7.1 Wirkung auf die Zellproliferationsrate

Der *WST-1*-Zellproliferatonstest lieferte für die mit Homozystein behandelten *Ea.hy 926*-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Homozystein inkubierten *SW 1353*-Zellen eine leichte Tendenz einer sinkenden Zellproliferation mit steigender Homozysteinkonzentration beobachtet. Dabei lieferte sowohl die Inkubation mit 10 µmol/l als auch die Inkubation mit 100 µmol/l Homozystein statistisch signifikante Effekte auf die Zellproliferationsrate im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrollprobe (Tab. 10).

Zelllinie	Homozysteinkonzentration [µmol/L]	Absorption (Mittelwert \pm SD)	<i>p</i>
<i>SW 1353</i>	0	0,655 \pm 0,013	-
	1	0,632 \pm 0,029	0,188
	10	0,617 \pm 0,016	0,009
	100	0,568 \pm 0,013	< 0,0001

Tab. 10: Überprüfung der durch Inkubation mit Homozystein (Hcy) induzierten Effekte auf die Zellproliferation. Angegeben sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) der A_{480} von 4 Parallelbestimmungen des *WST-1*-Zellproliferationstests für *SW 1353*-Zellen nach Inkubation mit Hcy in unterschiedlicher Konzentration (0/1/10/100 µmol/L) für 24h. *p*-Werte $< 0,05$ werden als statistisch signifikant betrachtet und sind **fett** gedruckt.

4.7.2. Durchflußzytometrische Messungen zur Bestimmung apoptotischer Zellen

4.7.2.1. Etablierung einer durchflußzytometrischen Analyse zur Detektion apoptotischer Zellen

Der Nachweis apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie erfolgte unter Verwendung des *Annexin V-FITC/ 7-AAD*-Kits. Dieses bietet den Vorteil, eines Apoptosenachweises bereits wenige Stunden nach erfolgter Apoptoseinduktion. Diese Methode beruht auf dem Nachweis von Phosphatidylserinresten, welche sich bei vitalen Zellen auf der Membraninnenseite befinden, bei apoptotischen Zellen jedoch auf der Membranaußenseite zu finden sind.

4.7.2.2. Durchflußzytometrische Messungen zur Unterscheidung von vitalen und nekrotischen Zellen

Zunächst wurde ein *FACS*-Protokoll erstellt, mit dem vitale Zellen von nekrotischen Zellen unterschieden werden können. Zur Induktion der Nekrose wurde eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation mit dieser wurden die Zellen zunächst angefärbt und anschließend durchflußzytometrisch analysiert.

Mittels Messung der Lichtstreuung im *SSC/FSC*-Diagramm kann die Morphologie der Zellen analysiert werden. Nekrotische Zellen erscheinen kleiner und weisen, verglichen mit vitalen Zellen, eine größere Granularität auf. Sowohl die untersuchten *SW 1353*-Zellen als auch die *Ea.hy 926*-Zellen wiesen deutliche Unterschiede zwischen unbehandelten und mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung inkubierten Zellen auf. Da die unbehandelten Zellen in beiden Fällen größer waren und eine geringere Granularität besaßen, konnten die mit Paraformaldehyd inkubierten Zellen als Positivkontrolle für nekrotische Zellen eingesetzt werden, die bei der Messung der Fluoreszenzintensität des 7-AAD im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe ein deutliches Signal zeigten. Mit Hilfe des 7-AAD-Histogramms kann die Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen quantifiziert werden.

4.7.2.3. Durchflußzytometrische Messungen zur Optimierung des Apoptose-Protokolls

Die Erstellung eines Apoptose-Protokolls am Durchflußzytometer erfolgte mit Hilfe von *Ea.hy 926*- und *SW 1353*-Zellen, bei denen durch Inkubation mit verschiedenen Statinen Apoptose induziert worden war, und die als Positivkontrolle für apoptotische Zellen dienen.

4.7.3. Wirkung des Homozysteins auf Zellproliferation und Apoptose

Nach 24stündiger Inkubation von endothelialen *Ea.hy* 926-Zellen mit Homozystein wurde ein prozentualer Anteil an vitalen Zellen zwischen 97,8 % und 98,4 % detektiert. Dies stellt im Vergleich zur Kontrolle (98,1 %) eine maximale Abweichung von 0,33 % dar. Der nach der Stimulation mit Hcy gemessene Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl wich nicht signifikant vom Wert der Kontrolle ab. (7,14 % bis 8,10 % verglichen mit 7,17 %; Tab. 11)

Zelllinie	Homozystein [$\mu\text{mol/L}$]	Viabilität	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]
<i>Ea.hy</i> 926	0	vital	98,1
		apoptotisch	7,17
		nekrotisch	1,91
	1	vital	97,8
		apoptotisch	8,10
		nekrotisch	2,17
	10	vital	98,2
		apoptotisch	7,68
		nekrotisch	1,82
	100	vital	98,4
		apoptotisch	7,14
		nekrotisch	1,58

Tab. 11: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen zur Untersuchung des Einflusses von Homozystein (Hcy) auf *Ea.hy* 926-Zellen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der Hcy-Konzentration (0/1/10/100 mol/L) nach 24stündiger Inkubation.

Auch für die *SW* 1353-Zellen ergaben die durchflußzytometrischen Messungen nach 24stündiger Inkubation mit Homozystein als Effektor einen Anteil an vitalen Zellen von 94,8 % bis 95,4 % und lagen damit im Bereich der Kontrolle (94,2 %). Der Anteil an apoptotischen Zellen war mit einer maximalen Abweichung von 0,63 % geringer als in der Kontrollprobe (Tab. 12).

Zelllinie	Homozystein [$\mu\text{mol/L}$]	Viabilität	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]
SW 1353	0	vital	94,2
		apoptotisch	2,48
		nekrotisch	5,81
	1	vital	94,8
		apoptotisch	2,11
		nekrotisch	5,25
	10	vital	95,4
		apoptotisch	1,85
		nekrotisch	4,64
	100	vital	95,1
		apoptotisch	1,93
		nekrotisch	4,95

Tab. 12: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen zur Untersuchung des Einflusses von Homozystein (Hcy) auf SW 1353-Zellen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der Hcy-Konzentration (0/1/10/100 mol/L) nach 24stündiger Inkubation.

4.8. Einfluß von TFPI auf die Zellproliferation und Apoptose von *Ea.hy 926*- und *SW 1353*-Zellen

Es wurde ebenfalls untersucht, ob eine erhöhte TFPI-Konzentration z.B. über einen *Feedback*-Mechanismus einen Einfluß auf die Zellproliferation oder die Apoptose insbesondere bei endothelialen Zellen hat. Für diese Messungen wurden drei unterschiedliche TFPI-Konzentrationen eingesetzt:

- 1.) 6,5 ng/ml (\approx 10 % der physiologischen Konzentration)
- 2.) 65 ng/ml (\approx physiologische Konzentration)
- 3.) 325 ng/ml (\approx 5-fache physiologische Konzentration)

Mit TFPI in diesen drei Konzentrationen wurden sowohl *Ea.hy 926*- als auch *SW 1353*-Zellen 24 Stunden lang in parallelen Ansätzen inkubiert und anschließend der Effekt auf die Zellproliferation und die Apoptose quantifiziert.

4.8.1. Einfluß des TFPI auf die Zellproliferationsrate

Es wurden im *WST-1*-Zellproliferationstest keine statistisch signifikanten Effekte des TFPI auf die Zellproliferationsrate sowohl der *Ea.hy 926*- als auch der *SW 1353*-Zellen detektiert (Tab. 13).

Zelllinie	TFPI [ng/mL]	Absorption (Mittelwert \pm SD)	<i>p</i>
<i>Ea.hy</i> 926	0	1,38 \pm 0,049	-
	6,5	1,36 \pm 0,066	0,532
	65	1,29 \pm 0,069	0,079
	325	1,41 \pm 0,049	0,494
SW 1353	0	0,463 \pm 0,008	-
	6,5	0,459 \pm 0,026	0,554
	65	0,472 \pm 0,045	0,212
	325	0,457 \pm 0,020	0,589

Tab. 13: A_{480} im WST-1-Test nach 24stündiger Inkubation der *Ea.hy* 926- und SW 1353-Zellen mit TFPI. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichungen (SD) von vier Parallelbestimmungen in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Konzentration des Effektors sowie die Ergebnisse des *t*-Tests (behandelte vs. Kontrollprobe) in Form von *p*-Werten. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4.8.2. Durchflußzytometrische Messungen der mit TFPI inkubierten *Ea.hy* 926- und SW 1353-Zellen zur Quantifizierung apoptotischer Zellen

Nach 24stündiger Inkubation der *Ea.hy*-Zellen mit TFPI war keine Abweichung des Anteils vitaler Zellen von mehr als 0,1 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle meßbar (97,4 % und 98,7 % vs. 98,1 %).

Der Anteil an apoptotischen Zellen hingegen betrug zwischen 6,47 % und 7,87 %, was einer maximalen Abweichung von lediglich 0,7 % im Vergleich zum Anteil apoptotischer Zellen in der Kontrollprobe entspricht (7,17 %; Tab. 14).

Zelllinie	TFPI [ng/mL]	Viabilität	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]
<i>Ea.hy 926</i>	0	vital	98,1
		apoptotisch	7,17
		nekrotisch	1,91
	6,5	vital	98,2
		apoptotisch	7,53
		nekrotisch	1,84
	65	vital	98,7
		apoptotisch	6,47
		nekrotisch	1,33
	325	vital	97,4
		apoptotisch	7,87
		nekrotisch	2,61

Tab. 14: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen zur Untersuchung des Einflusses von 24stündiger Inkubation mit TFPI auf *Ea.hy 926*-Zellen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der TFPI-Konzentration (0/6,5/65/325 ng/mL).

SW 1353-Zellen zeigten nach 24stündiger Inkubation mit TFPI einen um bis zu 2,3 % angestiegenen Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (95,5 % bis 96,5 % vs. 94,2 %) Der Anteil an apoptotischen Zellen betrug zwischen 2,05 % und 2,65 % und lag damit nahe dem Prozentsatz der Kontrollprobe mit 2,48 % (Tab. 15).

Zelllinie	TFPI [ng/mL]	Viabilität	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]
SW 1353	0	vital	94,2
		apoptotisch	2,48
		nekrotisch	5,81
	6,5	vital	96,5
		apoptotisch	2,05
		nekrotisch	3,46
	65	vital	95,6
		apoptotisch	2,23
		nekrotisch	4,42
	325	vital	95,5
		apoptotisch	2,65
		nekrotisch	4,49

Tab. 15: Prozentualer Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 24stündiger Inkubation von SW 1353-Zellen mit TFPI in unterschiedlichen Konzentrationen (0/6,5/65/325 ng/mL).

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rWT- und r[P151L]TFPI

Auf Grund der zentralen Rolle des TFPI in der Gerinnungskaskade hat vermutlich jeder Polymorphismus im humanen TFPI-Gen, der zu einer Änderung der Proteinkonformation oder zu einer Variation der Bindungseigenschaften des Proteins führt, auch einen Einfluß auf die regulatorische Wirkung des TFPI. Die erste im TFPI-Gen entdeckte Mutation, die 536C→T Transition, führt zu einem Austausch von Prolin zu Leucin im TFPI-Protein [36]. Da jedoch Prolin - im Gegensatz zu Leucin - eine Aminosäure ist, die vornehmlich β -Faltblatt-Strukturen bildet, führt diese Transition vermutlich zu einer Konformationsänderung in der zweiten Verbindungskette oder zu einer veränderten Position der inhibitorischen *Kunitz*-Typ Domäne. Diese Konformationsänderungen könnten die regulatorische Wirkung des Proteins beeinflussen und in einer früheren Studie konnten wir bereits zeigen, daß das Auftreten dieser Mutation mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombosen korreliert [37].

Da bisher jedoch noch kein homozygoter Träger der [P151L]TFPI-Mutante identifiziert werden konnte, stellt die Untersuchung des rekombinant dargestellten Proteins die einzige Möglichkeit dar, die Auswirkungen der 536C→T-Transition auf die biochemischen und pathophysiologischen Eigenschaften des TFPI zu charakterisieren. Durch die Etablierung von *High Five*-Zellen als effektives Modellsystem zur Expression rekombinanten TFPIs stehen ausreichend große Mengen sowohl des rWT-TFPI als auch der r[P151L]Mutante zur Verfügung, um diese charakterisieren zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden rWT-TFPI und r[P151L]TFPI untersucht, die in *High Five*-Insektenzellen exprimiert worden waren [Thyzel 2006]. Da die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium erfolgte und die Insektenzellen kein endogenes TFPI exprimieren, war keine Unterscheidung zwischen rekombinantem und endogenem Protein erforderlich.

Da für die *in vivo*-Wirkung des TFPI seine Bindung an verschiedene Liganden wie z.B. LDL, Lp(a) oder Zellen des vaskulären Endothels eine entscheidende Rolle spielt, wurde *in vitro* untersucht, ob rWT-TFPI und die r[P151L]Mutante Unterschiede bezüglich ihrer Bindungseigenschaften aufweisen [68]. Es zeigte sich, daß beide rekombinanten Proteine an immobilisiertes Lp(a), TF, FVIIa, FXa, Chondroitinsulfat A, Chondroitinsulfat C sowie an Heparin (UFH und LMWH) binden [69]. Hierbei konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Proteinen nachgewiesen werden. Die Bindung an die immobilisierten Liganden war für das rekombinante Wildtyp-Protein grundsätzlich stärker als für das r[P151L]Protein [70]. Da sowohl die rWT- als auch die r[P151L]TFPI-enthaltenden Zellkulturüberstände parallel verarbeitet wurden (z.B. einfrieren, auftauen), kann ein dadurch bedingter Effekt ausgeschlossen werden. Allerdings waren die TFPI-Konzentrationen in den

verschiedenen Proben unterschiedlich, so daß sie mittels BSA-Lösung auf einheitliche TFPI- und Gesamtproteinkonzentrationen gebracht wurden. Ein dadurch bedingter Effekt kann daher nicht vollends ausgeschlossen werden. Da jedoch die Untersuchung aufkonzentrierter Zellkulturüberstände untransfizierter *High Five*-Zellen denselben Effekt auf die aPTT des Poolplasmas hatte wie NaCl/P_i-Puffer, erscheint ein störender Einfluß anderer im Zellkulturüberstand enthaltener Proteine als sehr unwahrscheinlich.

Die deutlich differierenden Bindungsaffinitäten, welche die untersuchten Inhibitoren an die immobilisierten Liganden Chondroitinsulfat A und C auf der einen sowie Heparin (UFH und LMWH) auf der anderen Seite zeigten, lenken das Augenmerk auf den Einfluß, den die negative Ladungsdichte auf die TFPI-Bindung hat. Alle vier Glykosaminoglykane tragen zahlreiche Sulfatgruppen und die daraus resultierende Azidität dieser Moleküle ist ein wichtiger Faktor für die Bindung der basischen, C-terminalen Region des TFPI [70]. Beide rekombinanten Inhibitoren zeigen eine höhere Bindungsaffinität zu den Chondroitinsulfaten, obwohl die Heparine mehr negative Ladungen tragen [69]. Der beobachtete Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen rWT-TFPI und r[P151L]TFPI könnte aus einer Konformationsänderung resultieren, die zu einer ungünstigeren Lage der C-terminalen, für die Bindung relevanten, Bereiche führt.

Bezüglich ihrer Bindungsaffinität an immobilisierten *Tissue factor*, Faktor VIIa und Faktor Xa konnten für beide rekombinanten Proteine ähnliche Werte ermittelt werden. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Bindungsdomänen $\delta 1$ und $\delta 2$ in beiden Proteinen sterisch ähnlich erreichbar für die gebundenen Liganden sind. Da, im Gegensatz zu einem deutlichen und konzentrationsabhängigen Effekt bei Lipoprotein (a), keinerlei Bindung an LDL festgestellt werden konnte, scheint die Bindung hauptsächlich über den Proteinanteil und nicht den Lipidanteil des Lp(a) zu erfolgen [70].

5.2. Untersuchung der inhibitorischen Wirkung der rekombinanten Proteine auf die modifizierte Thromboplastinzeit (aPTT)

Im Rahmen der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierungen sowohl des rWT- als auch des r[P151L]TFPI konnte gezeigt werden, daß es sich bei der Bestimmung der modifizierten Thromboplastinzeit (aPTT) um eine geeignete Methode zur Quantifizierung der inhibitorischen Aktivität des TFPI in einem komplexen System handelt [71; 72]. Diese Bestimmung kann auch durchgeführt werden, wenn sich das zu charakterisierende Protein in einer hochkomplexen Matrix befindet, wie sie der Zellkulturüberstand von *High Five*-Insektenzellen oder Zitratplasma darstellt. Da die Zugabe von aufkonzentriertem Zellkulturüberstand untransfizierter *High Five*-Zellen zu keiner Veränderung der aPTT führte, die über den auch bei BSA-Lösung gemessenen Verdünnungseffekt hinausging, konnten Matrixeffekte ausgeschlossen werden. Nachdem zunächst die durch Zugabe einer BSA-Lösung mit einer der Gesamtproteinkonzentration im aufkonzentrierten Zellkulturüberstand entsprechenden Konzentration bedingte konzentrationsabhängige aPTT-Verlängerung bestimmt worden war (Abb. 6), konnte bei den anschließenden Messungen durch Vergleich mit dieser zwischen der durch Verdünnungseffekte bedingten und der durch die inhibitorische Wirkung des rekombinanten TFPI bedingten aPTT-Verlängerung differenziert werden [70].

Die durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses von rekombinantem TFPI auf die aPTT zeigten keinen signifikanten Unterschied in der inhibitorischen Wirkung zwischen rWT-TFPI und der r[P151L]Mutante. Diese Ergebnisse decken sich mit der Aktivitätsbestimmung mittels des *Actichrome* Aktivitätstests und anschließender Berechnung der spezifischen inhibitorischen Aktivität. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (11,3 mU/ng vs. 11,5 mU/ng). Jedoch muß bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, daß selbst deutliche Änderungen der Struktur und der Bindungseigenschaften nicht unweigerlich eine aPTT-Änderung bewirken. Bei der aPTT-Messung handelt es sich um einen komplexen *in vitro*-Test, bei dem zahlreiche Gerinnungsfaktoren und –Inhibitoren sowie zusätzlich Phospholipide und Ca^{2+} -Ionen eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu spielen für die *in vivo*-Wirkung des TFPI, die für den Wildtyp und die Mutante unterschiedlich zu sein scheint, weitere Effekte wie z.B. die Bindung an LDL oder endotheliale Oberflächen eine bedeutende Rolle spielen. Das Zusammenspiel dieser Faktoren könnte dazu führen, daß geringfügige Änderungen der Konformation oder der Bindungseigenschaften, wie sie bei der [P151L]Mutante vorliegen, zwar zu einer verringerten inhibitorischen Wirkung *in vivo* führen, diese aber im Rahmen der aPTT-Bestimmung nicht zu detektieren und quantifizieren ist.

5.3. Bedeutung des TFPI für die männliche Fertilität

Humanes Sperma setzt sich aus mehr als 30 verschiedenen Proteinen zusammen, von denen zahlreiche eine Bedeutung für dessen Gerinnung und Liquefizierung besitzen [46; 47]. Diese Gerinnungs- und Liquefizierungsprozesse beginnen bereits unmittelbar nach der Ejakulation und dauern etwa 15 bis 20 min. Die Gerinnung wird durch das Enzym Vasiculase initiiert und führt zur Bildung eines Fibrin-ähnlichen Materials [48; 73-75]. Während des anschließenden Liquefizierungsprozesses wird das hochmolekulare seminale Vesikelprotein durch, aus der Prostata stammende, Proteasen abgebaut [76]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Gerinnungs- und Liquefizierungseigenschaften des Ejakulats und der Samenqualität wurde bereits postuliert [77].

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals der Nachweis des TFPI in humanem Seminalplasma. Des weiteren deuten die gewonnenen Ergebnisse darauf hin, daß das TFPI eine nicht unwesentliche, bisher jedoch nicht bekannte und untersuchte, Rolle für die männliche Fertilität besitzt [45].

Die Ergebnisse der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der Ejakulatgerinnung und –Liquefizierung für die männliche Zeugungsfähigkeit und lenken das Augenmerk auf die Bedeutung der Hämostase- und Fibrinolysemarker im Zusammenhang mit der männlichen Zeugungsfähigkeit. Die erniedrigten TFPI-Konzentrationen, die im Seminalplasma infertiler Männer gefunden wurden, sind hierbei im Einklang mit den Ergebnissen von Van Wersch *et al.* [46], die ein vermindertes D-Dimer/Thrombin-Antithrombin-Verhältnis im Samen infertiler Männer sowie bei Männern nach Vasektomie gefunden haben und einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der verschiedenen Gerinnungsmarker im Seminalplasma und ungewollter Kinderlosigkeit postulieren. Auf Grund der sich weit überschneidenden 90%-Bereiche der TFPI-Konzentrationen, die im Seminalplasma infertiler Männer wie auch gesunder Samenspender gefunden wurden, erscheint die Bestimmung des TFPI als Fertilitätsmarker jedoch weniger geeignet.

5.4. TFPI-Konzentration in ovarieller Follikularflüssigkeit während der *In-vitro* Fertilisation (IVF)

Da es im Verlauf der Follikelreifung, bedingt durch einen permanenten Flüssigkeitseinstrom, zu einer extremen Volumenzunahme des Follikels und damit verbunden ständig zu Mikroläsionen und Mikroeinblutungen kommt, wird die Hämostase im Follikel ständig aktiviert. Um eine durch überschießende Gerinnung bedingte Entstehung von Thromben in den die Follikel versorgenden Gefäßen zu verhindern, ist vermutlich auch die TFPI-Synthese ständig aktiviert [42; 43]. Dadurch steht der Gerinnungsaktivierung mit dem TFPI der Hauptinhibitor des extrinsischen Weges der Blutgerinnung in hoher Konzentration entgegen.

Die Feststellung, daß TFPI in der humanen Follikelflüssigkeit (hFF) von Frauen, welche sich eine IVF unterziehen, in einer um den Faktor vier höheren Konzentration als im Blut vorliegt, verdeutlicht einerseits die Bedeutung des TFPI für die Follikelreifung und das Follikelwachstum, zeigt andererseits aber auch, daß eine TFPI-Synthese im Follikel stattfinden muß. Bei der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse muß jedoch auch berücksichtigt werden, daß die Follikularflüssigkeit von Patientinnen stammt, die sich im Rahmen ihrer IVF einer Hormontherapie unterziehen. Hierbei ist der Einfluß von hMG und hCG sowohl auf die TFPI-Level im Blut wie auch auf die TFPI-Synthese im Follikel noch nicht bekannt.

Diese Arbeit liefert erstmalig Aussagen über den Einfluß des Ovariellen Hyperstimulationssyndroms (OHSS) auf die TFPI-Konzentration in der Follikularflüssigkeit. Während eine italienische Gruppe [78] erniedrigte TFPI-Konzentrationen in Plasmaproben fand, die unter OHSS leidenden Frauen entnommen wurden, konnte nun gezeigt werden, daß die TFPI-Level in hFF etwa viermal höher als im Plasma sind [45]. Des weiteren gelang der Nachweis, daß diese hohen TFPI-Konzentrationen bei allen IVF-Patienten auftauchen, unabhängig vom Auftreten eines OHSS und dem Erfolg der IVF. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen weiterhin, daß die TFPI-Konzentration in der Follikularflüssigkeit bei Patientinnen mit einem OHSS, gleich welchen Schweregrades, sich nicht signifikant von der bei Nicht-OHSS-Patientinnen unterscheidet [79].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Gruppen [80-82] konnte gezeigt werden, daß die Schwangerschaftsrate bei OHSS-Patientinnen um etwa 50% höher war als bei Frauen, die keine Symptome eines OHSS während ihrer IVF zeigten. Dies läßt die Vermutung zu, daß die im Rahmen der IVF durchgeführte Hormonbehandlung, zwar bei steigender Intensität die Erfolgsaussicht der IVF steigert, gleichzeitig aber auch das Risiko für das Auftreten des Hyperstimulationssyndroms erhöht. Zudem variierten die Serum-E₂-Konzentrationen am Tag der hCG-Gabe nur minimal zwischen den vier Patientinnengruppen

(OHSS/Nicht-OHSS; schwanger/nicht-schwanger). Dies legt nahe, daß es sich beim 17- β -Östradiol (E₂) um keinen geeigneten Marker zur Vorhersage des Auftretens eines OHSS handelt [79].

Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es außerdem erstmalig den Nachweis einer Abhängigkeit der TFPI-Konzentration in der Follikularflüssigkeit vom Alter der untersuchten IVF-Patientinnen (Abb. 9) zu erbringen. Diese nimmt mit steigendem Alter der Frauen signifikant zu und stellt einen potentiellen Erklärungsansatz für die mit zunehmendem Patientenalter abnehmende Erfolgsquote der IVF dar.

5.5 Untersuchungen zur Korrelation zwischen TFPI- und Homozystein-Leveln unter besonderer Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Unterschiede

Die Untersuchung der TFPI-Plasmaspiegel hyperhomozysteinämischer Patienten (hHcy-Patienten) zeigte, daß diese im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv von Blutspendern mit normalwertigen TFPI-Konzentrationen signifikant erhöht waren. Dieser Effekt war bei weiblichen hHcy-Patienten zudem deutlich ausgeprägter als bei männlichen [83].

Auf Grund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach den diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden zu Grunde liegenden Mechanismen. Da das vaskuläre Endothel einen Hauptsyntheseort des TFPI darstellt, humane Endothelzellen *in vitro* eine deutliche Reaktion auf erhöhte Homozysteinkonzentrationen zeigen [84] und zudem bereits gezeigt werden konnte, daß Homozystein die endotheliale *Tissue factor*-Expression induziert [65-67], erscheint als Korrektiv zur Aktivierung dieses Weges der Gerinnungskaskade eine Hochregulation der Expression des TFPI, als wichtigstem Inhibitor, als eine Möglichkeit der Regulation *in vivo*.

Eine mögliche Erklärung für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Höhe der TFPI-Plasmakonzentration bei hHcy-Patienten könnte eine geschlechtsabhängige Reaktion des vaskulären Endothels auf die erhöhten Homozysteinkonzentrationen sein, die über die Östrogen-Rezeptoren (ERs) ER α und ER β vermittelt wird. Beide Östrogen-Rezeptoren finden sich auf endothelialen Zellen und es konnte bereits gezeigt werden, daß Östrogene eine direkte Rolle bei der Regulation der endothelialen Aktivität spielen [85]. Diese regulatorischen Effekte unterscheiden sich vermutlich bei männlichen und weiblichen Individuen, einerseits bedingt durch die unterschiedliche Anzahl der vorhandenen ERs andererseits durch eine unterschiedliche Sensitivität dieser Rezeptoren.

Während kein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Thyroidhormone und Hyperhomozysteinämie auf der einen sowie den TFPI-Plasmakonzentrationen auf der

anderen Seite festgestellt werden konnte, zeigte sich eine deutliche Korrelation mit den Triglyzeriden. Auch für andere Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen, wie LDL-Cholesterin, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen hHcy-Patienten und Blutspendern nachgewiesen werden, allerdings zeigten die hHcy-Patienten signifikant erhöhte Triglyzeridkonzentrationen. Und, ähnlich wie für die TFPI-Plasmakonzentrationen festgestellt, zeigte sich auch hier ein deutlich ausgeprägter Effekt bei den weiblichen Patienten [83]. Dies lenkt die Aufmerksamkeit einerseits auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulation der Hämostase und des Lipidstoffwechsels, zeigt andererseits aber auch, daß beispielsweise im Rahmen einer medikamentösen Therapie diese geschlechtsspezifischen Unterschiede beachtet werden müssen.

Zusammengefaßt unterstreichen die aktuellen Ergebnisse die Bedeutung des Homozysteins sowohl als Marker wie auch als potentielle Ursache thromboembolischer Ereignisse, insbesondere im Zusammenhang mit dem TFPI betrachtet. Auf Grund der Effekte, die Homozystein auf das Endothel hat und unter Berücksichtigung der besonderen Bedeutung des vaskulären Endothels als Hauptsyntheseort des TFPI, lassen die neuen Ergebnisse das TFPI als einen potentiellen Marker für endotheliale Aktivierungsprozesse, wie sie z.B. durch erhöhte Hcy-Konzentrationen ausgelöst werden können, erscheinen.

5.6. Induktion der TFPI mRNA-Expression in Endothelzellen *in vitro*

In zahlreichen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, daß die Gabe von LMWH und UFH *in vivo* zu einer schnellen und deutlichen Erhöhung der TFPI-Konzentration im Blut führt [86]. Allerdings sind die diesem Vorgang zu Grunde liegenden Mechanismen und auch der Ort der TFPI-Freisetzung bislang nicht abschließend geklärt. Da die elektrostatischen Bindungen zwischen TFPI und Membran-Glykosaminoglykanen (GAGs) schwächer sind als die zwischen TFPI und Heparin, bewirkt eine Heparingabe vermutlich zunächst die Freisetzung Glykosaminoglykan-gebundenen TFPIs und anschließend die Bildung von TFPI-Heparin-Komplexen [86]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen jedoch, daß Heparin nicht nur die Freisetzung von endothelgebundenem sowie intrazellulär gespeichertem TFPI in die Zirkulation bewirkt, sondern daß die Interaktion mit Heparin das antikoagulatorische Potential der Endothelzellen verändert. Es konnte gezeigt werden, daß *in vitro* sowohl unfraktioniertes als auch niedermolekulares Heparin eine signifikante zeit- und dosisabhängige Hochregulation der TFPI-mRNA Expression in *Ea.hy* 926-Endothelzellen bewirkt. Die zusätzliche Gabe einer äquivalenten Menge von Protamin

verringerte den Heparineffekt bei einer Konzentration von 1 U/mL Heparin deutlich, bei 10 U/mL Heparin wurde der Effekt des Heparins sogar vollständig neutralisiert.

Der Vergleich von niedermolekularem mit unfraktioniertem Heparin zeigte, daß LMWH eine deutlich stärkere Reaktion der Endothelzellen bewirkte, aber in therapeutische Dosierung keinen Effekt zeigte. Wie erwartet sorgten höhere UFH-Dosen für einen schnelleren und stärkeren Effekt als niedrigere Dosierungen. Die Untersuchungen zeigten, daß Heparin nicht nur einen Einfluß auf die Freisetzung des an der endothelialen Zelloberfläche gebundenen TFPI hat, sondern auch eine *de novo* TFPI-Synthese bewirkt.

Da beide Arten von Heparin regelmäßig zur Prophylaxe und Behandlung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden, ist ein tiefergehendes Wissen um ihre Wirkung auf die TFPI-Pathobiochemie auch aus therapeutisch-pharmakologischen Gesichtspunkten von großem Interesse.

Im Gegensatz zum stimulativen Effekt, den die Gabe von Heparin auf die TFPI-mRNA Expression in Endothelzellen hatte, zeigte sich nach Inkubation mit Chondroitinsulfat A und C eine Abnahme derselben. Dies zeigt deutlich, daß die unterschiedliche Struktur der verschiedenen Glykosaminoglykane sowie möglicherweise die unterschiedliche Anzahl an negativ geladenen Sulfo- und Carboxylgruppen einen starken Einfluß auf deren Bindungseigenschaften, in diesem Fall an die endotheliale Zelloberfläche, besitzt. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob auf der Oberfläche der Endothelzellen spezifische Heparin-Rezeptoren lokalisiert sind, da Chondroitinsulfat - wie Heparin - über zahlreiche negative Ladungen verfügt, aber keinen Effekt auf die Zellen zeigte.

Die Tatsache, daß die Erhöhung des TFPI-Levels im Blut eine endothelspezifische Reaktion auf die Verabreichung von Heparin darstellt, wird durch die Feststellung unterstrichen, daß die untersuchten SW 1353-Zellen nach Inkubation mit Glykosaminoglykanen keinerlei Reaktion zeigten. Um ausschließen zu können, daß die festgestellten Änderungen der TFPI-mRNA Expression auf einem generalisierten Effekt des Heparins auf die Zellproliferation und Apoptose beruhten, wurde die diese jeweils relativ zu einem konstant exprimierten Haushaltsgen bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellproliferationsraten bestimmt. Sowohl therapeutische als auch hypo- und hypertherapeutische Dosen von Heparin führten zu keinen meßbaren Effekten auf die Zellproliferation. Eine Quantifizierung der TFPI Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen, da die TFPI-Mengen im Zellkulturüberstand der mit den Effektoren versetzten Zellen auf Grund der kleinen Zellkulturvolumina unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten TFPI-Nachweise lagen.

5.7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die rekombinant in *High Five*-Insektenzellen exprimierte *Kunitz*-Typ Inhibitoren rWT-TFPI und r[P151L]TFPI auf Grund ihrer Bindungsaffinität zu verschiedenen immobilisierten Liganden sowie ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Thromboplastinzeit (aPTT) charakterisiert. Im Rahmen der zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der beiden Proteine durchgeführten Untersuchungen konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Protein und der [P151L]Mutante nachgewiesen werden. Diese unterstützen den *in vivo* dokumentierten Effekt einer erhöhten Neigung zu venösen Thrombosen bei heterozygoten Trägern der [P151L]Mutation. Allerdings zeigte die Untersuchung der beiden Inhibitoren im komplexen Testsystem der aPTT-Bestimmung keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante.

Ein wichtiges Ziel zur vollständigen Struktur- und Funktionsaufklärung des [P151L]TFPI stellt die Kristallisation dieses Gerinnungsinhibitors dar. Die rekombinante Expression in Insektenzellen lieferte zwar die notwendigen Mengen des Proteins, als problembehaftet hat sich jedoch die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erwiesen, so daß die Charakterisierungen nur in Zellkulturüberständen stattfinden konnten, die neben dem rTFPI auch zahlreiche weitere Proteine enthielten. Die Ergebnisse einer Röntgenstrukturanalyse könnten einen klaren Aufschluß über die Struktur der [P151L]Mutante geben und durch einen Vergleich mit der Struktur des Wildtyps Hinweise auf funktionelle Unterschiede liefern.

Neben dem erstmaligen Nachweis von TFPI in humanem Seminalplasma gelang mit der Bestimmung einer signifikant erniedrigten TFPI-Konzentration im Seminalplasma infertiler Männer ein klarer Hinweis auf die Bedeutung dieses, sonst nur mit der Hämostase in Verbindung gebrachten, Proteins für die männliche Fertilität. Hier wäre neben weiteren Untersuchungen zur Bedeutung der Gerinnungs- und Liquefizierungsprozesse auch ein Vergleich der TFPI-Plasma- mit den Seminalplasma-Konzentrationen der Männer notwendig, um ausschließen zu können, daß es sich bei den erniedrigten TFPI-Konzentrationen um ein generalisiertes und im gesamten Organismus festzustellendes Phänomen handelt.

Die hier erstmals festgestellte Abhängigkeit der TFPI-Konzentration in Follikularflüssigkeit vom Alter der Patientinnen sollte durch weitere Untersuchungen zur Korrelation zwischen der TFPI-Konzentration und dem Erfolg der *In vitro* Fertilisation ergänzt werden. Da eine mit steigendem Alter sinkende Erfolgsquote der IVF dokumentiert ist, liefert die steigende TFPI-Konzentration hier einen plausiblen potentiellen Erklärungsansatz.

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten erhöhten TFPI-Plasmalevel bei hyperhomozysteinämischen Patienten liefern einen neuen Erklärungsansatz für die bereits seit längerem

postulierte Einstufung des Homozysteins als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Sollte das Homozystein über eine Aktivierung der Endothelzellen zur einer deutlichen Erhöhung der TFPI-Plasmakonzentration führen, hätte dies eine Dysbalance der die Hämostase und Fibrinolyse regulierenden Faktoren zur Folge. Insbesondere die unterschiedliche Wirkung der erhöhten Hcy-Konzentrationen auf die TFPI-Level bei Männern und Frauen, sollte sowohl im Sinne der Risikoabschätzung für thromboembolische Ereignisse als auch in Bezug auf etwaige medikamentöse Therapien berücksichtigt werden.

Der Nachweis einer erhöhten TFPI-mRNA Expression nach vorausgegangener Stimulation von *Ea.hy 926*-Zellen mit Heparin (UFH wie auch LMWH) macht deutlich, daß die Gabe von Heparin *in vitro* und *in vivo* nicht nur zu einer prompten TFPI-Freisetzung von der Oberfläche endothelialer Zellen sowie aus intrazellulären Speichern sondern auch zu einer *de novo* Synthese führt. Das hier etablierte System zur Quantifizierung der TFPI-mRNA Expression mittels *Real Time PCR* ermöglicht es zukünftig beispielsweise die Wirkung verschiedener Heparine und Heparinderivate wie auch neuer Pharmazeutika auf die TFPI-Expression endothelialer Zellen zu charakterisieren.

6. Methoden

6.1. Molekularbiologische Methoden

6.1.1. Agarosegel-Elektrophorese

Da Nukleinsäure-Moleküle auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind, lassen sie sich durch elektrophoretische Verfahren in Gelmatrices ihrer Größe nach auftrennen. Als Matrix dient hier Agarose (glykosidisch verbundene D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose) in TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3), in der die Nukleinsäure-Moleküle in einem elektrischen Feld wandern. Bedingt durch den Molekülsiebeffekt des Agarosegels wandern kleine Moleküle in der Gelmatrix schneller als große. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 2,5 % verwendet. Die Detektion der DNA erfolgt mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und bei UV-Bestrahlung (Anregungswellenlänge 320 nm) eine charakteristische Fluoreszenz (Emissionswellenlänge 590 nm) aufweist.

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels, wird 1 g Agarose in 100 mL TBE- Puffer gelöst, aufgeköcht und mit Ethidiumbromidlösung versetzt (ca. 1 µg/mL). Vor dem Auftragen in die Geltaschen werden die Nukleinsäureproben mit 30 % Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgt bei 16 V/cm², wobei die durch Bromphenolblau bzw. Xylencyanol sichtbare Probenlauffront den Verlauf der Elektrophorese anzeigt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt.

6.1.2. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Um mittels Agarosegel-Elektrophorese die Größe von Nukleinsäurefragmenten zu bestimmen, wird zusätzlich zur Probe ein Größenstandard aufgetragen und durch Vergleich zwischen der Probe und dem Standard die Größe der Probenfragmente abgeschätzt.

verwendete Längenstandards:

DNA-Längenstandard	Fragmentgrößen (bp)
1 kb Längenstandard	12.216; 11.198; 10.180; 9.162; 8.144; 8.103; 7.162; 5.090; 4.072; 3.054; 2.036; 1.636; 1.018; 517; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75
pUC19/MspI-Längenstandard	501; 489; 404; 331; 242; 190; 147; 111; 110; 67; 34; 26

6.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Abschätzung der DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung kann durch den visuellen Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration im Agarosegel erfolgen. Eine genaue Quantifizierung ermöglicht die Messung der Absorption bei 260 nm. Hierfür wird die Probe gegen den Leewert (H₂O) in einer Quarzküvette mit 10 mm Strahlengang gemessen. Zur Berechnung der DNA-Konzentration c wird der Messwert mit dem Extinktionsfaktor f multipliziert, wobei für doppelsträngige DNA $f = 50$ gilt.

$$c = E_{260\text{nm}} \times f[\text{mg/L}]$$

6.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur DNA-Amplifikation [87]. Es basiert auf drei verschiedenen Schritten, welche zyklisch wiederholt werden:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
2. Primer-*Annealing* an einzelsträngige DNA
3. Amplifikation durch eine thermostabile Polymerase

Diese drei Schritte werden 25 bis 35 Mal wiederholt, wobei ab dem zweiten Zyklus die DNA exponentiell vervielfältigt wird.

Standard PCR-Ansatz (50 μL):

- 2,0 μL *Template*-DNA (Plasmid-DNA, genomische DNA)
- 5,0 μL 10x PCR-Puffer (250 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 1,0 μL *Forward*-Primer (25 μM)
- 1,0 μL *Reverse* Primer (25 μM)
- 0,5 μL dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 25 mM)
- 0,3 μL Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μL)
- ad 50 μL ddH₂O

Im Rahmen dieser Arbeit wird folgendes Standard-PCR-Protokoll verwendet:

Programmschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Denaturierung	1	94	35
<i>Annealing</i>	1	51-62	
<i>Extension</i>	3	72	
finale <i>Extension</i>	15	72	1

6.1.5. *Real-Time PCR am LightCycler*

Bei der *Real-Time* PCR (Echtzeit-PCR) handelt es sich um ein PCR-Verfahren, bei dem Amplifikation und Detektion eines PCR-Produktes parallel stattfinden. Zur Detektion von PCR-Produkten stehen *SYBR Green* oder verschiedene Sonden, wie z. B. Hybridisierungssonden als Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wird für die Detektion und Quantifizierung von Amplifikaten *SYBR Green* eingesetzt.

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG ist ein Reagenz, das neben dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I*, die *Platinum Taq* DNA-Polymerase, 3 mM MgCl₂, Uracil-DNA Glycosylase (UDG) sowie Dosoxyribonucleotid-Triphosphate (dNTPs) mit dUTP anstelle von dTTP enthält. *SYBR Green I* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der direkt an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Bei der quantitativen Real-Time PCR erzeugt dieser Fluoreszenzfarbstoff ein Signal, das proportional zur DNA-Konzentration ist. Die *Platinum Taq* DNA-Polymerase ist mit spezifischen monoklonalen Antikörpern komplexiert, die die Aktivität der *Taq* Polymerase bei Raumtemperatur inhibieren. Die Polymerase-Aktivität wird durch den initialen Denaturierungs-Schritt wiederhergestellt. Dadurch wird eine unspezifische Amplifikation verhindert. Das in dem Reagenz enthaltene dUTP führt dazu, daß jegliche amplifizierte DNA Uracil enthält. Die Uracil-DNA Glycosylase (UDG) entfernt Uracil-Reste sowohl von einzelsträngiger als auch von doppelsträngiger DNA und verhindert damit, daß dU-enhaltende kontaminierende DNA von vorausgegangenen Reaktionen während der Real-Time PCR als DNA-Matrize dient. Die UDG wird anschließend bei den hohen Temperaturen der PCR inaktiviert, so daß eine Amplifikation der Zielsequenz ermöglicht wird.

Durch die Emissions-Messung während der *Annealing*-Phase kann die Amplifikation des PCR-Produktes verfolgt werden. Für die Quantifizierung wird der C_p -Wert (*crossing point*) genutzt. Hierbei handelt es sich um den Zeitpunkt (Zyklanzahl), bei dem sich die Amplifikation des PCR-Produktes in einer exponentiellen Phase befindet und das Fluoreszenz-Grundsignal überschritten wird (Abb.: 13).

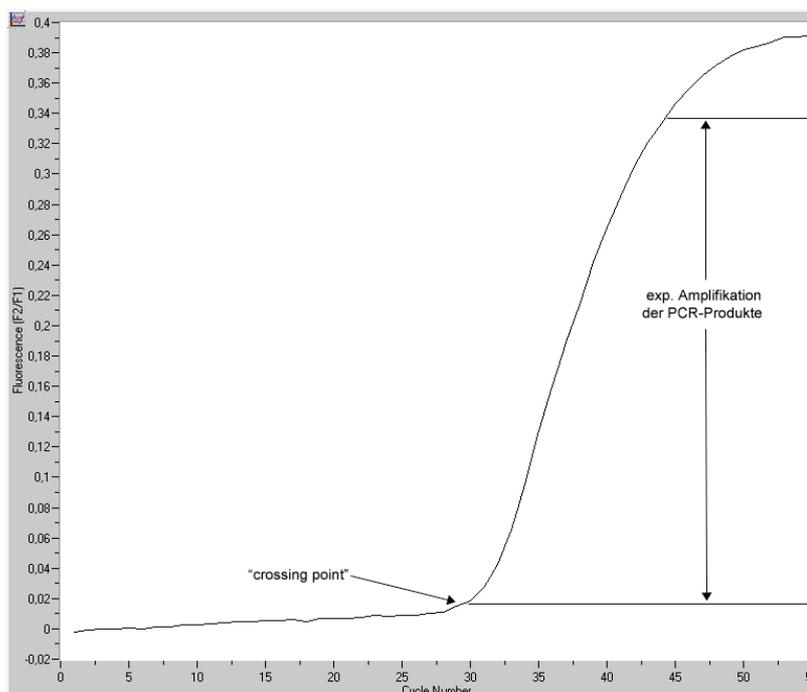


Abb. 13: Fluoreszenzabhängige Detektion eines PCR-Produktes. Der C_p -Wert (*crossing point*), bei dem die Amplifikation des PCR-Produktes sich in einer exponentiellen Phase befindet, ist gekennzeichnet.

Nach Abschluß der Amplifikationsphase besteht die Möglichkeit, mit den entstandenen PCR-Produkten eine Schmelzkurvenanalytik, d.h. eine Untersuchung des Denaturierungsverhaltens der doppelsträngigen DNA in Abhängigkeit von der Temperatur, durchzuführen. Alle Messungen werden mit dem *LightCycler*-System durchgeführt. Durch die Verwendung von Glaskapillaren, mit einem günstigen Oberflächen-Volumenverhältnis, können im Vergleich zu einer Standard Thermoblock-PCR wesentlich schnellere Temperaturübertragungen auf die Reaktionskammer realisiert werden.

Standard *Real-Time* PCR-Ansatz (20 μ L):

5,0 μ L	<i>Template-DNA</i>
10,0 μ L	<i>SYBR Green</i>
0,5 μ L	Forward-Primer (25 μ M)
0,5 μ L	Reverse-Primer (25 μ M)
1,0 μ L	nicht-acetyliertes BSA
ad 20 μ L	ddH ₂ O

Standard *Real-Time* PCR-Protokoll:

Programmschritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/sec]	Zyklenzahl
Aktivierung der UDG	120	50	20	1
Denaturierung der UDG/ Aktiv. d. DNA-Polymerase	120	95	20	1
Denaturierung	5	94	20	50
<i>Annealing</i>	15	58		
<i>Extension</i>	10	72		
Schmelzkurve	15	50	20	1
	30	50 – 95	0,15	

verwendete Primer : (TFPI)

- a) 1_1_U742 5`-GAGACACTGGAAGAATGC-3`
1_1_L905 5`-CACAATCCTCTGTCTGCT-3`
- b) 1_2_U637 5`-CCTGGAATATGTTCGAGGT-3`
1_2_L854 5`-GTTGATTGCGGAGTCAG-3`
- c) 1_3_U472 5`-ACTCGACAGTGCGAAGA-3`
1_3_L653 5`-CCTCGACATATTCCAGG-3`
- d) 1_4_U705 5`-CAAGTATGGTGGATGCCT-3`
1_4_L921 5`-CAATCCTCTGTCTGCTGG-3`
- e) 1_5_U472 5`-ATCTGACAGTGCGAAGAA-3`
1_5_L721 5`-GGCATCCACCATACTTGA-3`
- f) 1_6_U770 5`-GTGAAGATGGTCCGAATG-3`
1_6_L924 5`-ACACAATCCTCTGTCTGC-3`
- g) 1_7_U637 5`-CCTGGAATATGTTCGAGGT-3`
1_7_L787 5`-CATTTCGGACCATCTTCAC-3`

(Haushaltsgene)

* β_2 -Mikroglobulin:

- U122 5`-CGTCATCCAGCAGAGA-3`
L252 5`-GACAAGTCTGAATGCTCC-3`

*Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase:

- U404 5`-CATGGATGACCTTGGCCAG-3`
L579 5`-TCTTCACTACCATGGAGAAGG-3`

*Ubiquitin:

- U46 5`-CTCCACCTCCAGGGTGAT-3`
L97 5`-GATTCAGGATAAGGAAGGCAT-3`

6.1.6. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme gehören zur Gruppe der Endonukleasen. Sie dienen ursprünglich dem Schutz der Bakterien vor Fremd-DNA und spalten Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen positions- und sequenzspezifisch. Für diesen Vorgang benötigen Endonukleasen des Typs II kein ATP, sondern lediglich Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor. Es existieren drei verschiedene Klassen von Nukleasen, die anhand ihrer Erkennungssequenz eingeteilt werden. Die meisten Nukleasen gehören zur Klasse II, die palindromische DNA-Sequenzen von meist 4-8 bp erkennen und Homodimere bilden. Durch die Spaltung entstehen entweder kohäsive Enden (*sticky ends*), bei denen ein DNA-Strang überhängt oder stumpfe Enden (*blunt ends*), bei denen weder das 3'- noch das 5'-Ende des Doppelstrangs überhängt [88].

Die Produkte der Restriktionsspaltung werden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Standard-Restriktionsansatz:

	400 ng DNA
	1,0 μ L 10x-Puffer
	0,5 μ L Restriktionsenzym (5 U/ μ L)
	ad 10 μ L ddH ₂ O

6.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

DNA-Fragmente, die von einem Wirtsorganismus repliziert und transkribiert werden sollen, können vor der Transformation in einen zirkulären Vektor kloniert werden. Dafür werden Vektor und DNA-Fragment zunächst mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten, um eine Hybridisierung ihrer Enden zu ermöglichen. T4-DNA-Ligase katalysiert anschließend die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'- und 3'-Enden doppelsträngiger DNA sowohl bei kohäsiven wie stumpfen Enden [89].

Standard-Ligationsansatz:

10 – 100 ng	Plasmid-DNA
20 – 200 ng	Insert-DNA
3 μ L	T4-DNA-Ligase (1 U/ μ L)
4 μ L	5x T4-Ligase Puffer (250 nM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % PEG-8000)
ad 20 μ L	ddH ₂ O

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 10 – 30°C inkubiert.

6.1.8. Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem *TOPO TA Cloning Kit*

PCR-Produkte, die durch eine *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert wurden und daher ein 3'-überhängendes Adenin-Nukleotid besitzen, können direkt in den Vektor *pCR2.1-TOPO* kloniert werden. Dieser liegt linearisiert im Komplex mit Topoisomerase I vor und besitzt 3'-überhängende Thymidinenden. Das DNA-Fragment wird von der Topoisomerase in den Vektor ligiert.

Standardligationsansatz: 4,0 µL PCR-Produkt
 1,0 µL *Salt Solution*
 1,0 µL *pCR2.1-TOPO*-Vektor

Die Komponenten des Ligationsansatzes werden vorsichtig auf Eis gemischt und danach 30 min bei RT inkubiert. Das Ligationsprodukt kann anschließend direkt in der Transformation eingesetzt werden.

6.1.9. Nukleinsäureextraktion und -reinigung

6.1.9.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (*Escherichia coli*)

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *QIAprep Spin Miniprep Kit* basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Hierbei werden Plasmide aus Bakterien isoliert, indem diese zunächst alkalisch hydrolysiert und anschließend die genomische DNA gefällt wird. Die Plasmid-DNA bleibt weiterhin in Lösung und wird unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgelmatrix gebunden [90].

6.1.9.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* basiert auf einer Säulenaffinitätschromatographie, bei der die RNA an eine modifizierte Silikatoberfläche gebunden wird.

Die adhärenen Zellen werden analog zum Passagieren mit EDTA/Trypsin-Lösung von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst und zentrifugiert. Das dabei gebildete Zellpellet wird in 1 mL Medium resuspendiert, in ein 1,5 mL-Mikrozentrifugengefäß überführt und für 3 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Zellen werden in einem 10 % β -Mercaptoethanol enthaltenden Lysepuffer resuspendiert, auf eine Filtersäule aufgetragen und durch Zentrifugation

homogenisiert. Zu dem dadurch geklärten Lysat wird 70 %iger Ethanol gegeben und diese Lösung auf eine Silikatsäule aufgetragen, an welche die RNA bindet. Die Säule wird mehrfach gewaschen, um Salze zu entfernen, anschließend die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und RNase-Inhibitor (*RNaseOUT*) zugegeben.

6.1.10. RNA-Formamid-Agarosegel-Elektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung der Isolierung von RNA wird eine Agarosegel-Elektrophorese unter RNase-inhibierenden Bedingungen durchgeführt. Als Matrix dient ein 1,5 %iges Agarosegel. Auf dieses werden die zuvor gemischten je 2 µL RNA-Probe, 2 µL Formamid sowie 2 µL Auftragspuffer aufgetragen und anschließend bei 16 V/cm² aufgetrennt.

6.1.11. Reverse Transkriptase-PCR (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wird aus Zellen oder Geweben isolierte mRNA in komplementäre DNA (*complementary DNA/cDNA*) umgeschrieben. Für diese Reaktion nutzt man die Aktivität des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT). Es werden Oligo-dT-Primer verwendet, was dazu führt, daß nur polyadenylierte RNA revers transkribiert wird [91]. Zur cDNA-Synthese wird im Rahmen dieser Arbeit eine kommerziell erhältliche reverse Transkriptase eingesetzt (*SuperScript II* Reverse Transkriptase). Zwischen 1 ng und 5 µg RNA werden mit 1 µL Oligo-dT-Primer (7 pmol), 1 µL dNTPs (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) gemischt und mit RNase-freiem H₂O auf 12 µL aufgefüllt. Dieser Ansatz wird 5 min bei 65°C inkubiert und zügig auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 4 µL 5x *First-Strand-Buffer* sowie 2 µL 0,1 M DTT. Der Ansatz wird gut gemischt und bei 42°C für 2 min inkubiert. Schließlich wird 1 µL *SuperScript II* RT dazugegeben und der Reaktionsansatz zunächst für 5 min bei 25°C und anschließend für 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen für 15 min bei 70°C inaktiviert und die entstandene cDNA wird bei -20 °C aufbewahrt.

6.1.12. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird das *QIAExII Agarose Gel Extraction Kit* verwendet. Bei dieser Methode wird die DNA durch Adsorption an eine Kieselgelmatrix unter Hochsalzbedingungen aus dem Agarosegel extrahiert.

Zunächst wird die, unter UV-Anregung sichtbare, DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und überschüssiges Gel nach Möglichkeit entfernt. Anschließend werden zu dem Agarosegelfragment die dreifache Masse von Puffer QX1 sowie 30 μL QIAExII (Matrix) zugegeben, das Gemisch 10 min bei 50°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet je einmal in 500 μL Puffer QX1 und zweimal in 500 μL Puffer PE resuspendiert, jeweils abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Trocknen des Pellets wird die DNA mit 20 μL ddH₂O eluiert.

6.1.13. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung mittels PCR amplifizierter DNA-Fragmente wird das *QIAquick PCR Purification Kit* verwendet. Das Prinzip dieser Aufreinigungstechnik basiert auf einer Affinitätschromatographie, bei der die Nukleinsäuren unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgelmatrix gebunden werden. Verunreinigungen wie Primer, Nukleotide, Enzyme und Salze können anschließend durch Waschen entfernt und die PCR-Produkte wieder eluiert werden.

6.1.14. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger [92] mit anschließender Auftrennung durch Kapillarelektrophorese. Das verwendete *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaktion Kit* enthält neben Desoxynukleotiden (dNTP) auch Didesoxynukleotide (ddNTP), die bei ihrem Einbau auf Grund der fehlenden 3'-OH-Gruppe am Zuckerbaustein im Nukleotid einen Abbruch der Komplementärstrangsynthese verursachen. Die ddNTPs sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert. Dieses Verfahren führt zu einer linearen Anreicherung unterschiedlich langer fluoreszenzmarkierter Produkte. Bei der automatisierten Auftrennung der markierten Fragmente im Kapillarsequenzierer werden die Fragmente fluorometrisch detektiert und die DNA-Sequenz rekonstruiert.

Standard-Sequenzieransatz:

- 3,0 μL aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1,5 μL *reverse* bzw. *forward* Primer (25 μM)
- 4,0 μL Prämix-Sequenziergemisch (Puffer, MgCl₂, *Taq*-Polymerase)
- 2,0 μL *BigDye Sequencing Buffer* (5x)
- 9,5 μL HPLC-gereinigtes H₂O

Temperaturprofil:

Programmschritt	Zeit [sec]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Aktivierung	120	94	1
Denaturierung	10	96	25
<i>Annealing</i>	10	48	
<i>Extension</i>	240	60	

Die Aufreinigung des Sequenzieransatzes erfolgt über Gelfiltration mittels *Micro Bio Spin P-30* Säulen. Vor der Verwendung wird die Säule zum Resuspendieren des Gels und Entfernung evtl. vorhandener Luftblasen mehrfach invertiert. Die Säule wird geöffnet, die obere Kappe entfernt, die Säule in ein 2 mL-Zentrifugengefäß gegeben und für 2 min bei 3000 g zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu verdichten. Die gepackte Säule wird nun in ein neues Zentrifugengefäß gestellt und 20 µL Sequenzieransatz ohne Mineralöl werden aufgetragen. Anschließend wird für 4 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Eluat enthält die aufgereinigte DNA und wird mit 20 µL HPLC-H₂O verdünnt, in ein 0,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 94°C denaturiert. Die Auftrennung des Sequenzieransatzes und die Fluoreszenzdetektion erfolgt im *ABI Prism Collector 310*.

6.2. Proteinchemische Methoden

6.2.1. Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Lösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellkulturüberständen und Reproduktionsflüssigkeiten erfolgt mit dem Bicinchoninsäure-(BCA)-Proteinassay nach Pierce [93].

Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine in alkalischer Lösung. 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bicinchonin (*Bicinchoninic acid*) ist ein für Cu(I) spezifisches chromogenes Reagenz, dessen Umsetzung photometrisch bei 562 nm quantifiziert werden kann. Als Standard wird eine Verdünnungsreihe von BSA-Lösungen (0-1000 mg/mL) verwendet. Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben.

6.2.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht. *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) ist ein anionisches Detergens, das fast alle nicht-kovalenten

Wechselwirkungen in nativen Proteinen überdeckt, so daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen [94]. Zur Auflösung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur werden die Proben mit SDS erhitzt. Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgt durch Thiolverbindungen wie z.B. Dithiotreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol.

Für die SDS-PAGE werden vorgefertigte Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) in einem Bis-Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Als denaturierender Puffer dient MOPS mit SDS-Zusatz. Die Proben werden zur Vorbereitung mit SDS-haltigem Probenpuffer und 0,5 m DTT für 10 min bei 70°C erhitzt. Das Gel wird in der Elektrophoresekammer befestigt, 200 mL MOPS-SDS-Laufpuffer und 500 μ L *NuPAGE* Antioxidanz in die innere Pufferkammer gefüllt und die Geltaschen mit Puffer gespült. Die Proben sowie zusätzlich 5 μ L eines Proteinstandards werden aufgetragen und die äußere Pufferkammer mit 800 mL MOPS-SDS-Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese wird für ca. 90 min bei 120 V und 50 mA durchgeführt.

Laufpuffer (20x):

104,6 g	MOPS
60,6 g	Tris
10,0 g	SDS
3,0 g	EDTA
ad 500 mL	ddH ₂ O
pH 7,7 einstellen	

Probenpuffer (4x):

4,0 g	Sucrose
0,68 g	Tris
0,67 g	Tris-HCl, pH 8,5
0,80 g	SDS
6,0 mg	EDTA
750 μ L	Serva Blau G250 (1 %)
250 μ L	Phenolrot (1 %)
ad 10 mL	ddH ₂ O

See Blue Pre-Stained Standard:

Protein	Größe [kDa]
Myosin	191
BSA	64
Glutamat-Dehydrogenase	51
Alkohol-Dehydrogenase	39
Carboanhydrase	28
Myoglobin	19
Lysozym	14
Aprotinin	6
Insulin (B-Kette)	3,5

Mark12 Wide Range Protein-Standard:

Protein	Größe [kDa]
Myosin	200
β -Galaktosidase	116
Phosphorylase B	97
BSA	66
Glutamat-Dehydrogenase	55
Laktat-Dehydrogenase	37
Carboanhydrase	31
Trypsininhibitor	22
Lysozym	14
Aprotinin	6
Insulin (B-Kette)	3,5
Insulin (A-Kette)	2,5

6.2.3. Bestimmung der modifizierten Thromboplastinzeit (aPTT)

Bei der Bestimmung der modifizierten Thromboplastinzeit (aPTT) wird Plasma mit einem Kontaktaktivator versetzt und damit die Aktivierung der sog. Kontaktfaktoren (FXII, FIX) ausgelöst. Gleichzeitig dienen im Testreagenz enthaltene Phospholipide als Ersatz für die Phospholipide der Thrombozytenoberfläche. Nach einer kurzen Inkubationsphase wird in einem zweiten Schritt der Start der Gerinnungskaskade durch Zugabe von Kalziumionen ermöglicht und die Zeitspanne von der Zugabe der Kalziumchloridlösung bis zum Auftreten

eines ersten Thrombus gemessen. Zur quantitativen Bestimmung der antikoagulatorischen Aktivität des rekombinanten Wildtyp und [P151L]TFPI wird die verdünnte Thromboplastinzeit (dPTT) eines Poolplasmas mit und ohne Zugabe des rekombinanten Inhibitors bestimmt [95]. Aufkonzentrierte Zellkulturüberstände von *High Five-Insektenzellen* werden mittels einer BSA-Lösung auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration gebracht, um einen störenden Einfluß unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auszuschließen. Des Weiteren werden unterschiedliche Volumina von ZKÜ sowie von BSA-Lösung zugegeben, um den Einfluß des Verdünnungseffektes auf die PTT zu bestimmen. Die Messung der dPTT erfolgt mittels eines Kugelkoagulometers.

Standard dPTT-Ansatz:

100 µL Citratplasma
 5 – 25 µL Zellkulturüberstand oder BSA-Lösung
 100 µL *Actin FS*
 → Inkubation für 2 min bei 37°C
 100 µL CaCl₂

6.2.4. Chromogener TFPI-Aktivitätstest

Beim *Actichrome* TFPI-Aktivitätstest handelt es sich um einen chromogenen Test, zur Quantifizierung aktiven TFPIs in Plasma oder Zellkulturüberstand.

Der Test bestimmt die Fähigkeit des TFPI, die katalytische Aktivität des TF/VIIa-Komplexes zur Aktivierung von FX zu FXa zu inhibieren. Nach Inkubation des Probenmaterials mit TF/VIIa und FX wird die verbliebene Aktivität des TF/VIIa-Komplexes mittels *Spectrozyme-FXa* ermittelt. Beim *Spectrozyme-FXa* handelt es sich um ein hochspezifisches chromogenes Substrat, welches durch im Test gebildeten FXa, unter Freisetzung von p-Nitroanillin (pNA) als Chromophor, gespalten wird. Die Absorption des pNA wird bei 405 nm gemessen und mit einer Standardkurve verglichen.

6.2.5. Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rekombinanten TFPI

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Inhibitoren und zum Vergleich von rWT- und r[P151L]TFPI werden ihre Bindungseigenschaften an verschiedene Liganden (UFH, LWMH, LDL, Lp(a), Chondroitinsulfat A/C, TF, FVIIa, FXa) getestet. Hierzu wird zunächst der Ligand an eine Polystyroloberfläche gebunden, wobei in Abhängigkeit vom

zu immobilisierenden Liganden unterschiedliche Kunststoffoberflächen verwendet werden. Die theoretische Bindungskapazität einer Polystyroloberfläche beträgt hierbei maximal 400 ng Protein/cm². Nach dem Bindungsschritt wird die Oberfläche zunächst mit PBST abgesättigt, anschließend werden die immobilisierten Liganden mit aufkonzentriertem rTFPI-enthaltenden Zellkulturüberstand inkubiert und schließlich mehrfach gewaschen. Durch Zugabe eines peroxidasegekoppelten Antikörpers wird anschließend das an den immobilisierten Liganden gebundene rTFPI detektiert und anschließend eine OPD-Substratlösung umgesetzt. Der bei dieser Reaktion entstehende Chromophor kann photometrisch bei 405 nm detektiert werden und die gemessene Absorption ist proportional zur Konzentration des an den immobilisierten Liganden gebundenen rTFPI [68; 96].

6.3. Immunologische Methoden

6.3.1. Western-Blot

Im Anschluß an die SDS-PAGE können die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf einer Membran mittels der *Semidry*-Blot-Technik immobilisiert werden [97]. Dabei werden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch in einer Halbtrockenzelle (Blotkammer) auf eine PVDF-Membran übertragen, wobei das Bandenmuster der Auftrennung erhalten bleibt [98]. Die Detektion der auf der Membran immobilisierten Proteine erfolgt dann mittels Immunofärbung.

6.3.2. Quantitativer immunologischer Nachweis der Gesamt-TFPI-Konzentration

Beim *Imubind Total TFPI ELISA* handelt es sich um einen enzymvermittelten *Sandwich-Immunoassay* zur Quantifizierung von TFPI in Zellkulturüberstand, Citrat-Plasma und anderen Körperflüssigkeiten. Dieser ELISA detektiert sowohl freies TFPI als auch Komplexe mit *Tissue factor* und Faktor VIIa (TF/VIIa/TFPI). Binäre Komplexe mit Faktor Xa (TFPI/Xa) und quarternäre Komplexe mit TF, Faktor VIIa und Faktor Xa (TF/VIIa/TFPI/Xa) werden ebenfalls detektiert, allerdings mit geringerer Sensitivität.

Der *Imubind Total TFPI ELISA* verwendet einen Kaninchen anti-human TFPI polyklonalen Antikörper als *capture*-Antikörper. Verdünnte Plasma-Proben oder Zellkulturüberstände werden in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte inkubiert, die mit diesem *capture*-Antikörper beschichtet sind. TFPI wird durch einen biotinylierten monoklonalen Antikörper detektiert, der spezifisch für die Kunitz-Domäne $\delta 1$ des TFPI ist. Die anschließende Bindung von Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxydase (HRP) schließt die Bildung des Antikörper-Enzym-Detektions-Komplexes ab. Durch Zugabe von *TMB*-Substrat und seine Reaktion mit der Peroxidase entsteht ein blauer Farbstoff. Die Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure, welche die Reaktion stoppt und die blaue in eine gelbe Farbe umwandelt, erhöht die Sensitivität des ELISA. Die TFPI-Konzentrationen (Meßbereich: 0,360 – 2,50 ng/mL TFPI) werden durch Absorptionsmessung bei 450 nm und Vergleich mit einer Standardkurve bestimmt (Abb 14).

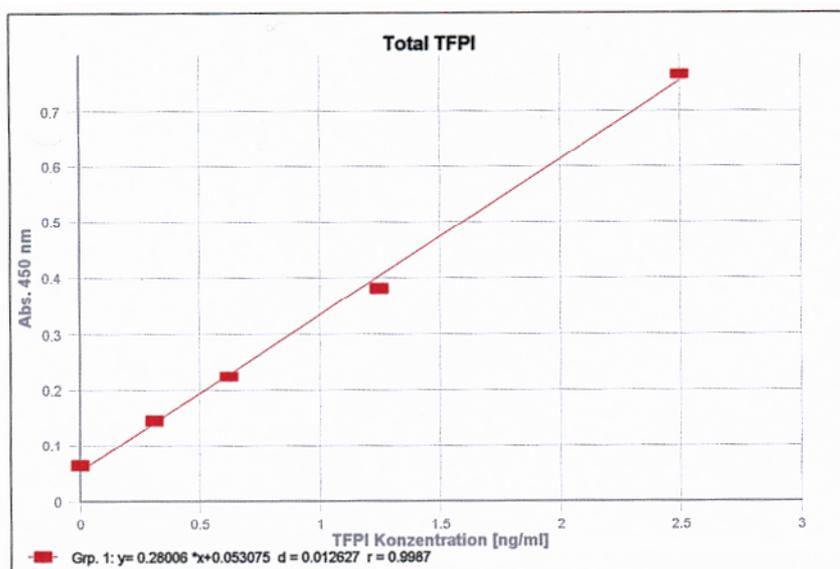


Abb. 14: Standardkurve des *Imubind Total TFPI ELISA* zur quantitativen TFPI-Bestimmung.

6.3.3. Quantitative Bestimmung von Gesamt-Trijodthyronin (Gesamt-T₃)

Die quantitative Bestimmung von Gesamt-Trijodthyronin findet mit dem ARCHITECT ci8200-Analysengerät (Abbott) statt. Der ARCHITECT Gesamt T₃-Test ist ein Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-T₃ in Serum und Plasma.

Zunächst wird das Probenmaterial mit anti-T₃ beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln gemischt. Nach Bindung des T₃ an die Partikel und Waschen, wird ein T₃-Akridinium-markiertes Konjugat zugegeben. Die Chemilumineszenzreaktion wird schließlich durch Zugabe der *Pre-Triggerlösung* sowie der *Triggerlösung* ausgelöst und in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Menge an Gesamt-T₃ in der Probe ist zu den gemessenen RLE umgekehrt proportional.

6.3.4. Quantifizierung von freiem Thyroxin (freiem T₄)

Freies Thyroxin (fT₄) wird mit dem ARCHITECT ci8200-Analysengerät quantitativ bestimmt. Beim ARCHITECT Freies T₄-Test handelt es sich, wie beim Gesamt T₃-Test, um einen Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA). Mit diesem kann fT₄ in Plasma und Serum quantitativ bestimmt werden.

Durchführung und Reaktionsprinzip entsprechen der Bestimmung des Gesamt T₃.

6.3.5. Quantitative Bestimmung von Thyreotropin (TSH)

Die Bestimmung der Thyreotropinkonzentration in Plasma und Serum erfolgt analog der Gesamt T₃- und fT₄-Bestimmung mit dem ARCHITECT ci8200-Analysengerät. Auch beim ARCHITECT TSH-Test handelt es sich um einen Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay (CMIA).

Die Durchführung entspricht der Bestimmung des Gesamt T₃ bzw. fT₄, allerdings ist bei der TSH-Bestimmung die Menge an TSH in der Probe den gemessenen RLE direkt proportional.

6.3.6. Quantitative immunologische Homozysteinbestimmung

Die Quantifizierung von Homozystein (Hcy) findet am AxSYM-Analysengerät (Abbott) statt. Beim AxSYM Homozystein Assay handelt es sich um einen Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA) zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-L-Homozystein in Humanserum oder -plasma.

Homocystin, gemischtes Disulfid und proteingebundene Formen von Hcy werden zunächst durch DTT zu freiem Hcy reduziert, welches anschließend durch S-Adenosyl-L-Homozystein-Hydrolase (SAH-Hydrolase) und Adenosin im Überschuß zu SAH umgewandelt wird. SAH und der markierte Fluoreszein-*Tracer* konkurrieren um die Bindungsstellen am monoklonalen AK-Molekül, und die Intensität des polarisierten Fluoreszenzlichtes wird gemessen.

6.4. Zellkultur

6.4.1. Kultivierung von Bakterien (*Escherichia coli*)

6.4.1.1. Anzucht von *Escherichia coli* in Flüssigkultur und auf Festmedien

Für die Vermehrung von *E.coli* werden Volumina von 5 bis 50 mL LB-Medium verwendet [88]. Bei Ampicillin-resistenten Stämmen werden dem Medium 50-150 µg/mL Ampicillin zugesetzt, bei Zeocin-Resistenz 250 µg/mL dieses Antibiotikums. Das Medium wird mit Zellen inokuliert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für die Anzucht auf Festmedien wird 2 % Agar verwendet. Hierbei wird die Zellsuspension auf einer Agarplatte verteilt und 24 - 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

6.4.1.2. Kryokonservierung von *Escherichia coli*

Zur längerfristigen Lagerung revitalisierbarer Bakterien, werden diese bei –80°C als Glycerinkultur eingefroren. Hierzu wird mit einer sterilen Impföse Zellmaterial von der Agarplatte entnommen, in Gefriermedium (20 % Glycerin, 80 % LB/Amp-Medium) resuspendiert und bei –80°C eingefroren.

6.4.1.3. Transformation von *TOP10*-Zellen

Die Transformation wird mit dem kommerziell erhältlichen, chemisch kompetenten Stamm *TOP10* durchgeführt.

Die *TOP10*-Zellen werden auf Eis aufgetaut und 2 µL des *TOPO TA Cloning*-Ansatzes oder des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Dann wird der Reaktionsansatz 30 min auf Eis inkubiert, für 30 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, sofort wieder auf Eis gelagert und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 250 µL warmes SOC-Medium zugegeben und der Transformationsansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert. Von der Bakterien-suspension werden anschließend 30 µL auf einer LB/Amp-Platte sowie der restliche Transformationsansatz auf einer zweiten LB/Amp-Platte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert [99].

Um die *TOPO TA Cloning* Reaktion auf erfolgreiche Insertion der DNA hin zu überprüfen, wird diese auf X-Gal-Platten ausplattiert. Bakterienklone, bei denen die DNA erfolgreich in das Plasmid inseriert wurde, erscheinen weiß, da der β-Galaktosidase codierende Genlokus durch diese Insertion unterbrochen wird. Bakterienklone ohne inserierte DNA hingegen erscheinen blau, da sie X-Gal mittels β-Galaktosidase umsetzen können.

6.4.2. Kultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung der Insektenzellen erfolgte serumfrei unter Zusatz von 10 µg/mL Gentamycin. Folgende Zelllinie und Medium wurden verwendet:

High Five-Insektenzellen

Insect Xpress Zellkulturmedium

6.4.2.1. Kultivierung von *High Five*-Insektenzellen in Adhäsionskultur

Die Kultivierung der *High Five-Insektenzellen* erfolgt in sterilen Zellkulturflaschen und –schalen, deren Oberflächenbeschaffenheit ein adhärentes Wachstum der Zellen begünstigt, bei 27°C im Brutschrank. Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilem Einwegmaterial durchgeführt.

Zur Vermehrung werden die Zellen einer Zellkulturflasche auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierzu werden 20 mL des Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit den verbleibenden 10 mL von der Oberfläche abgespült. Jeweils 2 mL der Zellsuspension werden in eine neue 175 cm²-Flasche mit 30 mL Medium gegeben und weiter inkubiert.

6.4.2.2. Kultivierung von *High Five*-Insektenzellen in Suspensionskultur

Zur Kultivierung der Insektenzellen in Suspension werden in einer 2000 mL-Roller-Zellkulturflasche 230 mL Zellkulturmedium vorgelegt. Von zwei konfluent bewachsenen 175-cm²-Zellkulturflaschen wird das Medium bis auf 10 mL entfernt. Mit diesen 10 mL Medium werden die anheftenden Zellen abgelöst und die Zellsuspension in die Rollerkultur gegeben. Im Brutschrank werden die Roller-Zellkulturflaschen bei 27°C inkubiert, wobei sie mit einer Geschwindigkeit von 2 Umdrehungen/min gedreht werden. Nach 5-7 Tagen kann der Zellkulturüberstand geerntet werden.

6.4.2.3. Kryokonservierung von Insektenzellen

Zur Konservierung revitalisierbarer Zellkulturen über einen Zeitraum von mehreren Jahren werden Zellsuspensionen von ca. 80 % konfluenten Kulturflaschen hergestellt. Anschließend werden je 500 µL der Zellsuspension (ca. $0,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL) mit 500 µL 4°C-kalten

Einfriermediums (30 % FCS, 10 % DMSO, 30 % frisches Medium, 30 % konditioniertes Medium) gemischt. Diese werden dann zunächst in styroporummantelten Edelstahlblöcken langsam auf -80°C abgekühlt und nach 24 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.4.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Ein definiertes Volumen einer Zellsuspension wird mit 0,2 % Trypanblau-Lösung vermischt. Unter einem Phasenkontrastmikroskop kann die Lebendzellzahl anschließend in einer Neubauerzählkammer bestimmt werden. Tote Zellen und Zelltrümmer sind dunkel angefärbt, da Trypan-Blau durch die nicht intakte Zellmembran dringen kann, während vitale Zellen hell erscheinen. Die ermittelte Zellzahl ($\times 10^5$) entspricht der Gesamtzellzahl in 1 mL Zellsuspension, wobei eventuelle Verdünnungen zu berücksichtigen sind.

6.4.2.5. Transfektion von *High Five*-Insektenzellen

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingeschleust. Hierzu können verschiedene Methoden zu Anwendung kommen, wie z.B. die Calciumphosphatmethode, Elektroporation, Mikroinjektion, die Verwendung von aktivierten Dendrimeren oder kationischen Liposomen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz *CELLFectin* verwendet, bei dem es sich um ein Reagenz zur liposomenvermittelten Transfektion handelt. Transfektionsreagenzien, die auf der Basis von Liposomen wirken, enthalten eine Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden. Bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Liposomen und den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bilden sich DNA-Liposomenkomplexe. Diese Transfektionskomplexe gelangen durch Endozytose in das Zellinnere. Ein Vorteil der liposomenvermittelten Transfektion im Vergleich zur Calciumphosphatmethode liegt in der häufig höheren Transfektionseffizienz bei gleichzeitig besserer Reproduzierbarkeit. Allerdings können hohe Transfektionsraten bei der liposomenvermittelten Transfektion i.d.R. nur in Abwesenheit von Serum erzielt werden. Des weiteren unterscheidet man zwischen der transienten und der stabilen Transfektion. Bei der transienten (vorübergehenden) Transfektion wird die Fremd-DNA in den Zellkern eingeführt, integriert aber nicht in die Chromosomen. Dadurch liegen viele Kopien des Gens vor, was zu einem hohen Proteinexpressionsniveau führt. Allerdings findet nach ca. 48 h keine weitere Expression des rekombinanten Proteins statt. Bei der stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA entweder in die chromosomale DNA integriert

oder als Episom aufgenommen. Dies führt zu einer dauerhaften Expression des rekombinanten Proteins.

Am Vortag der Transfektion werden die Insektenzellen passagiert und ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 60 mm-Zellkulturschale in antibiotikahaltigem *InsectXpress* Medium ausgesät. Nach 18 – 24 h Inkubation können die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50 – 60 % transfiziert werden. Dazu werden in einem sterilen 2 mL-Reaktionsgefäß pro Transfektionsansatz 2 µL DNA-Lösung und 100 µL antibiotika- und serumfreies Medium vorsichtig gemischt. In einem zweiten sterilen Reaktionsgefäß werden 3-20 µL *CELLFectin*-Reagenz und 100 µL des antibiotika- und serumfreien Mediums gemischt. Beide Ansätze werden vereinigt, durchmischt und zur Bildung der DNA-Liposomenkomplexe bei RT bei 45 min inkubiert. Zur Vorbereitung der Transfektion wird das antibiotikahaltige Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit 2 mL antibiotikafreiem Medium gewaschen. Anschließend werden zu dem DNA/Liposomen-Ansatz 1,8 mL antibiotikafreien Mediums hinzugefügt, vorsichtig durchmischt und die Lösung auf die Zellen getropft. Dieser Transfektionsansatz wird nun für 3 bis 24 h bei 27°C im Zellkulturschrank erschütterungsfrei inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird das Medium abgesaugt und durch 3 mL antibiotikahaltigen Zellkulturmediums ersetzt.

6.4.2.6. Selektion stabiler *High Five*-Zellklone

Nachdem die *High Five*-Zellen wie oben beschrieben transfiziert wurden, erfolgt die Selektion auf plasmidhaltige Zellen durch Zugabe von *Blasticidin S* zum Zellkulturmedium.

48 h nach der Transfektion wird das Medium von den Transfektionsansätzen abgesaugt und durch 2 mL *Insect Xpress*-Medium (ohne *Blasticidin S*) ersetzt. Die Zellen werden durch Abspülen von der Oberfläche abgelöst und resuspendiert. Diese Zellsuspension mit *Insect Xpress*-Medium auf ein Volumen von 10 aufgefüllt und folgendermaßen verteilt:

- a) 2 mL Zellsuspension + 3 mL Medium ohne *Blasticidin*
- b) 8 mL Zellsuspension

Nach 48 h Inkubation bei 27°C wird von den Ansätzen das Medium entfernt und jeweils 5 mL *Insect Xpress*-Medium (+ 80 µg/mL *Blasticidin*) zugegeben. Das *Blasticidin*-haltige Medium wird alle 5 Tage gewechselt.

6.4.3. Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte in serumhaltigem Medium (10 % FCS) unter Zugabe von 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 0,25 µg/mL Amphotericin. Folgende Zelllinien und Medien wurden verwendet:

<i>Ea.hy926</i> , human	DMEM Zellkulturmedium
<i>SW 1353</i> , human	RPMI 1640 Zellkulturmedium

6.4.3.1. Kultivierung der verschiedenen humanen Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgt in sterilen Zellkulturschalen bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 99 % rel. Luftfeuchtigkeit. Das Zellkulturmedium wird alle 2-3 Tage gewechselt und alle verwendeten Medien werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Zur Vermehrung der Zellkulturen werden die Zellen einer Zellkulturflasche auf mehrere Flaschen aufgeteilt. Dazu wird zunächst das Medium entfernt, die an der Oberfläche anhaftenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 5 mL Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach etwas 3-minütiger Inkubation werden die abgelösten Zellen in Medium aufgenommen, durch Zentrifugation pelletiert, in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

6.4.3.2. Kryokonservierung humaner Zellen

Adhärent wachsende Zellen (75 % Konfluenz) werden zunächst analog zum Passagieren abgelöst. Die pelletierten Zellen werden anschließend in Einfriermedium (2,5 mL FCS/ 10 % DMSO) resuspendiert (ca. 1×10^7 Zellen/ mL) und je 500 µL der Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese werden anschließend innerhalb von 24 Stunden langsam auf -80°C abgekühlt. Nach 48 Stunden werden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgt möglichst schnell im 37°C-Wasserbad. Die aufgetauten Zellen werden in vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen (15 mL/Kryoröhrchen) und bei 37°C kultiviert.

6.5. WST-1-Zellproliferationstest

Bei der Untersuchung von Zellpopulationen spielen die zelluläre Proliferationsrate und die Vitalität eine entscheidende Rolle. Der *WST-1*-Zellproliferationstests ermöglicht es, anhand der Substratumsetzung einer definierten Anzahl von Zellen die Teilungsrate bzw. die Vitalität der Zellen zu bestimmen.

Der Test beruht auf der Umsetzung des hellroten Tetrazoliumsalses 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzen-Disulfonat (*WST-1*) zu dunkelrotem wasserlöslichen Formazan durch metabolisch aktive Zellen (Abb. 15). Das *WST-1*-Reagenz dringt in die Zellen ein und anschließend wird dessen Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien umgesetzt. Unmittelbar nach Bildung des Formazans kann der Test photometrisch ausgewertet werden.

Die zu untersuchenden Zellen ($1-3 \times 10^3$ Zellen pro Kavität) werden in Mikrotiterplatten ausgesät (100 μL pro Kavität) und so lange bei 37°C inkubiert bis sie adhären sind. Anschließend werden die Zellen mit den zu untersuchenden Wachstums- oder inhibitorischen Faktoren für 24 Stunden inkubiert. Dann werden 10 μL *WST-1*-Reagenz pro Kavität dazugegeben und die Zellen weitere 0,5 – 4 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Die Absorption kann schließlich im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 420-480 nm und einer Referenzwellenlänge von >600 nm gemessen werden.

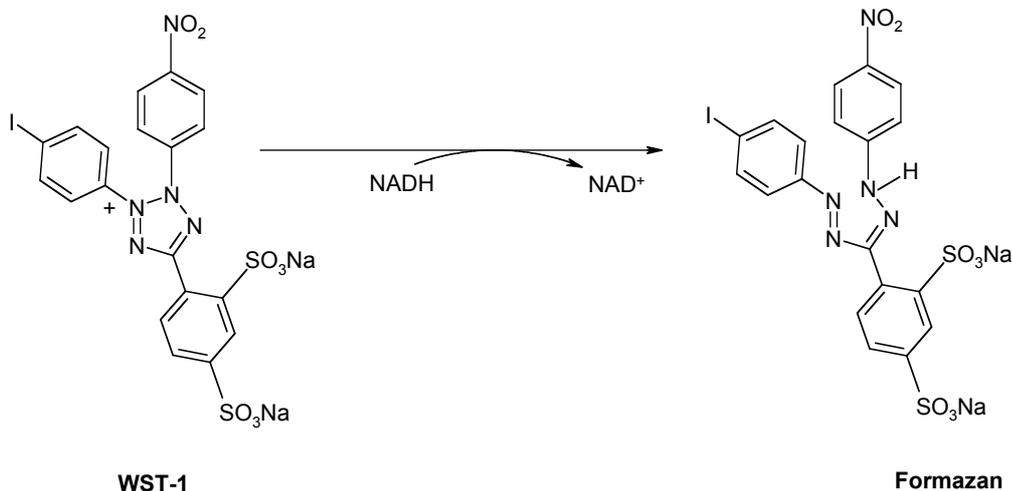


Abb. 15: Umsetzung des *WST-1*-Reagenz zum Formazan.

6.6. Nachweis apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie

Die Messung mit dem Durchflußzytometer (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*) ermöglicht eine Charakterisierung von Zellen durch die Analyse von Zelloberflächenmolekülen. Hierzu werden an Zelloberflächenmoleküle fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Proteine gebunden und diese im FACS detektiert. Die Zellen der Zellsuspension werden vereinzelt, und passieren anschließend einzeln nacheinander Laserstrahlen. An den Zellen kommt es zur Lichtstreuung, und die Farbstoffmoleküle, die an die Zelle gebunden sind, werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht. Die Lichtstreuung liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen. Die Fluoreszenz hingegen ermöglicht Aussagen über die Bindung der markierten Proteine an die Zelloberfläche.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Annexin V-FITC/7-AAD-Kit* wird zum Nachweis apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie eingesetzt. Bei lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose jedoch wird es auf die Außenseite der Membran transloziert. Makrophagen können Phosphatidylserin erkennen und phagozytieren apoptotische Zellen. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Dieses Protein kann daher als empfindlicher Marker für apoptotische Zellen eingesetzt werden. Da bei nekrotischen Zellen durch den Verlust der Membran-Integrität FITC-markiertes Annexin V in die Zellen eindringen und an die Innenseite der Membran binden kann, ist bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V-FITC eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht möglich. Daher wird zusätzlich 7-AAD (7-Amino-Actinomycin) als DNA-Farbstoff eingesetzt, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann. Lebende Zellen sind daher bezüglich ihrer Färbung sowohl FITC- als auch 7-AAD- negativ, apoptotische Zellen sind FITC-positiv und 7-AAD-negativ und nekrotische Zellen sind schließlich sowohl FITC- als auch 7-AAD-positiv.

6.7. Quantitative Bestimmung von Triglyzeriden

Die quantitative colorimetrische Bestimmung von Triglyzeriden in Humanserum und -plasma findet mit dem ARCHITECT ci8200-Analysengerät (Abbott) statt.

Die im Probenmaterial enthaltenen Triglyzeride werden zunächst enzymatisch zu freien Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Bei der Phosphorylierung von Glycerin durch ATP und Glycerinkinase entsteht Glycerin-3-phosphat und ADP. Das hierbei gebildete Glycerin-3-phosphat oxidiert durch Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroazetonphosphat unter Bildung

von Wasserstoffperoxid. Dieses H_2O_2 reagiert nun in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion mit 4-Aminotipyrin und 4-Chlorphenol unter Bildung eines roten Farbstoffs. Die Extinktion des so gebildeten Farbstoffs ist proportional zur Triglyzeridkonzentration im Probenmaterial.

6.8. Enzymatische Bestimmung von LDL-Cholesterin im Serum

Die Quantifizierung von LDL-Cholesterin im Humanserum findet mit dem ARCHITECT-ci8200 Analysengerät (Abbott) durch direkte enzymatische Bestimmung statt.

Im ersten Schritt wird das im Probenmaterial in Form von VLDL, HDL und Chylomikronen enthaltene Cholesterin durch Cholesterin-Esterase und Cholesterin-Oxidase eliminiert. Im zweiten Schritt wird das übriggebliebene LDL-Cholesterin durch spezielle tensioaktive Verbindungen in ein farbiges Chinonderivat umgewandelt, dessen Farbintensität proportional zur LDL-Cholesterinkonzentration in der Probe ist.

7. Material und Geräte

7.1. Zelllinien

7.1.1. Eukaryotische Zelllinien

<i>Ea.hy 926</i> , Fusionszelllinie (HUVEC/Lungenkarzinom), human	Institut für Pathologie, Universität von North-Carolina, USA
<i>SW1353</i> , Chondrosarkom, human	ATCC HTB-94
<i>High Five</i> , Ovarzellines des Kohlweißlings (<i>Trichplusia ni</i>)	Invitrogen, San Diego, USA

7.1.2. Bakterienstamm *Escherichia coli*

TOP10 Invitrogen, Groningen, Niederlande

Genotyp: *mcrA*, $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS.mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lac74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*,
 $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galk* λ^- , *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Dieser Bakterienstamm wird zur Transformation und Vermehrung rekombinanter Plasmide eingesetzt. Er ist rekombinationsdefekt (*recA1*) und ihm fehlt das Endonuclease A-Gen (*endA1*), was zu einer stabilen Plasmidreplikation führt. Die Aktivität endogener Restriktionsenzyme wird durch den Locus *hsdRMS* eliminiert und dieser *E.coli*-Stamm besitzt keine natürlich Ampicillin oder Zeocin-Resistenz.

7.2. Zellkulturmedien

<i>Ea.hy 926</i>	DMEM-Medium	Sigma, Taufkirchen
<i>SW 1353</i>	RPMI 1640-Medium	Sigma, Taufkirchen
<i>High Five</i>	Insect Xpress	Cambrex, Verviers, Belgien

Die Kultivierung der *E.coli*-Zellen erfolgt in LB/Amp-Flüssigmedium (*Luria bertani*) oder auf LB/Amp- bzw. X-Gal-Agarplatten.

LB/Amp-Flüssigmedium:
 1,0 % Pepton aus Fleisch
 1,0% NaCl
 0,5 % Hefeextrakt
 + 50 µg/mL Ampicillin

LB/Amp-Agar:
 1,0 % Pepton aus Fleisch
 1,0 % NaCl
 0,5 % Hefeextrakt
 2,0 % Agar
 + 50 µg/mL Ampicillin

X-Gal-Agar: + 64 mg/L X-Gal

7.3. Reagenzien

1 kb-Längenstandard	Gibco, BRL, Eggenstein
4-Chloro-1-naphtol	Sigma, Taufkirchen
<i>Actin FS Activated PTT Reagent</i>	Dade Behring, Deerfield, USA
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Aqua Braun	B. Braun, Melsungen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Anti-V5-HRP Antikörper	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>AmpliTaq</i> DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
Blasticidin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
BSA	Merck, Darmstadt
<i>CELLFectin</i> Transfektionsreagenz	Gibco BRL, Eggenstein
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
dNTP	Promega, Mannheim
<i>EcoR1</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FCS	PAA,
Formamid	Roth, Karlsruhe

<i>Fugene6</i> Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Gentamycin	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Heparansulfat	Sigma, Taufkirchen
<i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Homocystein	Sigma, Taufkirchen
<i>HotStarTaq</i> DNA Polymerase	Quigen, Hilden
H ₂ O ₂	Sigma, Taufkirchen
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LMWH (Innohep multi)	LEO Pharma, Neu-Isenburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Merck, Darmstadt
<i>NuPAGE</i> Antioxidans	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>NuPAGE</i> LDS-Probenpuffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>NuPAGE</i> reduzierendes Agens	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>NuPAGE</i> Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>NuPAGE</i> Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Pepton aus Fleisch	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Reaktionspuffer 10x	MBI Fermentas, St. Leon Rot
RNase Out	Invitrogen, Groningen, Niederlande
T4-Ligase	Promega, Mannheim
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, 10x)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypan-Blau	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
UFH (Liquemin)	Roche, Grenzach-Wyhlen
VivaSpin	Vivascience, Hannover
WST-1-Reagenz	Roche, Mannheim
X-Gal	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Xho1</i>	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

7.4. Reagenziensätze

<i>ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
<i>Actichrome TFPI Activity Assay</i>	American Diagnostica, Stamford, USA
<i>Annexin V-FITC/7-AAD Kit</i>	Beckmann Coulter, Marseille Cedex, Frankreich
<i>Eucaryotic TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Immubind Total TFPI ELISA Kit</i>	American Diagnostica, Stamford, USA
<i>Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>pMIB-V5-His A, B, C Vector Kit</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>QIAEXII Agarose Gel Extraktion Kit</i>	QIAgen, Hilden
<i>QIAgen HiSpeed Plasmid Purification Kit</i>	QIAgen, Hilden
<i>QIAgen Plasmid Mini Kit</i>	QIAgen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAgen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAgen, Hilden
<i>Superscript II RNase H Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen
<i>WST-1 Zellproliferationstest</i>	Roche, Mannheim

7.5. Puffer und Lösungen

Probenauftragspuffer:	0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau, 60% Saccharose in H ₂ O
Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0:	0,1 M Zitronensäure; 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat
PBS, pH 7,4:	0,05 Dinatriumhydrogenphosphat; 0,15 M Natriumchlorid
Substratlösung:	1 mL 4-Chloro-1-naphtol (3 mg/mL in Methanol), 5 mL Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0; 2,4 µL H ₂ O ₂ (30%)

7.6. sonstige Materialien

Sterile Einweg-Kunststoffwaren, u.a. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Zellkulturschalen, wurden von den Firmen Greiner Bio-one, Sarstedt, ABgene und Nerbe plus bezogen. Glaskapillaren für den LightCycle wurden von der Firma Roche bezogen.

7.7. Geräte

Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
DNA-Sequenziergerät	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Durchflußzytometer	Beckmann Coulter, Marseille Cedex, Frankreich
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg; AGS, Heidelberg
ELISA-Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubator	Biometra, Göttingen
Kugelkoagulometer	Amelung, Lemgo-Lieme
LightCycler	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Renner, Darmstadt
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
pH-Meter	Knick, Berlin
Photokamera	Polaroid, St. Albans, UK
Photometer	LKB-Pharmacia, Freiburg
Spannungsquelle	Life Technologies, Eggenstein
Schüttler	Renner, Darmstadt
Sterilbank für GVOs	Safelab-Systems, Bristol, UK
Sterilbank für Zellkultur	Waldner, Wangen
Temperaturbad	Julabo, Seelbach
Thermocycler	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen; Whatman Biometra, Göttingen
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
Zentrifugen	Hettich, Tuttlingen; Heraeus, Hanau
Vortex	Heidolf, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen

7.8. Softwareprogramme und Datenbanken

Align Plus 2.0	Scientific & Educational Software
Entrez (PubMed)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Expo 32 ADC	Beckmann Coulter
LightCycler Software 3.5	Roche
Magellan 4	Tecan
Oligo Primer Analysis 5.0	National Biosciences
Seqman 3.03	DNASStar Inc.
Sequence Analysis 3.7	Perkin Elmer
Prism 4	Graph Pad Software

8. Abkürzungen

A	Ampère
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary Units</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy-DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _p	<i>Crossing Point</i>
CS-A	Chondroitinsulfat A
CS-C	Chondroitinsulfat C
CTP	Cytosintriphosphat
d	2'-Desoxy(ribo)-
Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FVII	Faktor VII
FVIIa	Aktivierter Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FVIIIa	Aktivierter Faktor VIII

FIX	Faktor IX
FIXa	Aktivierter Faktor IX
FX	Faktor X
FXa	Aktivierter Faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	Aktivierter Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	Aktivierter Faktor XII
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
Hcy	Homozystein
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
hFF	Humane ovarielle Follikelflüssigkeit
hHcy	Hyperhomozysteinämie
His	Histidin
HRP	<i>Horseradisch peroxidase</i> / Meerrettichperoxidase
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IVF	<i>In vitro</i> -Fertilisation
k	Kilo
kb	Kilobasen
L	Liter
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LMWH	Niedermolekulares Heparin
m	Milli
M	Molar
μ	Mikro
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MW	Mittelwert
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>

n	Nano
OHS	Ovariellles Hyperstimulationssyndrom
OPD _{405nm}	Optische Dichte bei 405 nm
OTA	Oligo-, Terato-, Asthenozoospermie
p	Piko
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,1% <i>Tween-20</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
rWT TFPI	Rekombinanter Wildtyp <i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
r[P151L]TFPI	Rekombinante [P151L] <i>Tissue factor pathway inhibitor</i> Mutante
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
T4	Bakteriophage T4
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
[P151L]TFPI	[P151L] <i>Tissue factor pathway inhibitor</i> -Mutante
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
U	Unit / Einheit der Enzymaktivität
UDP	Uridindiphosphat
UFH	Unfraktioniertes Heparin
ÜN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

V	Volt
VLDL	<i>Very-low-density-lipoprotein</i>
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Abkürzungen für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen für DNA-Basen:

A	Adenin	C	Cytosin
G	Guanin	T	Thymin

9 Literatur

- [1] Greiling, H. und Gressner, A.M. (1995) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage, 887ff., Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- [2] Löffler, G. und Petrides, P.E. (1988) Physiologische Chemie, 4. Auflage, 781-865, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [3] <http://www.NovoNordisk.de>
- [4] Kienast, J. and Ostermann, H. (1993) Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Zeitschr. Cardiol.* **82**, Suppl.2, 65-69.
- [5] Davie, E.W. (1995) Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb. Haemost.* **74**, 1-6.
- [6] Bajaj, M.S., Birktoft, J.J., Steer, S.A. and Bajaj, S.P. (2001) Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor (review). *Thromb. Haemost.* **86**, 959-972.
- [7] Luchtmann-Jones, L. and Broze, G.J.Jr. (1995) The current status of coagulation. *Ann. Medicine.* **27**, 47-52.
- [8] Salemink, I., Franssen, J., Willems, G.M., Hemker, H.C., Li, A., Wun, T. and Lindhout, T. (1998) Factor Xa cleavage of tissue factor pathway inhibitor is associated with loss of anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.* **80**, 273-280.
- [9] Wun, T., Kretzmer, K.K., Girard, T.J., Miletich, J.P. and Broze, G.J.Jr. (1988) Cloning and characterization of cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J. Biol. Chem.* **263**, 6001-4.
- [10] Girard, T.J., Warren, L.A., Novotny, W.F., Bejcek, B.E., Miletich, J.P. and Broze G.J. (1989) Identification of the 1.4 kb message from the lipoprotein-associated coagulation inhibitor and expression of the encoded protein. *Thromb. Res.* **55**, 37-50.
- [11] Girard, T.J., Eddy, R., Wesselschmidt, R.L., MacPhail, L.A., Likert, K.M., Byers, M.G., Shows, T.B. and Broze, G.J.Jr. (1991) Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intron/exon gene organization and localization of the gene to chromosome 2. *J. Biol. Chem.* **206**, 5036-41.
- [12] Brinkmann, T., Schmidt, M., Prohaska, W. and Kleesiek, K. (2001) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Biochemistry, genetics and implications for thrombophilia. *J. Lab. Med.* **25**. 269-276.
- [13] Van der Logt, C.P., Reitsma, P.H. and Bertina, R.M. (1991) Intron-exon organisation of the human gene coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor: the factor Xa dependent inhibitor of the extrinsic pathway of coagulation. *Biochemistry* **30**, 1571-77.

- [14] Tyson, D.R., Kuppuswamy, M.N., Broze, G.J.Jr. and Bajaj, S.P. (1993) Revised DNA sequence of exon 1 and 5 flanking region of the human tissue factor pathway inhibitor gene. *Thromb. Res.* **70**, 269-273.
- [15] Kato, H. (1996) Tissue factor pathway inhibitor; its structure, function and clinical significance. *Pol. J. Pharmacol.* **222**, 195-209.
- [16] Enjyoji, K., Emi, M., Mukai, T. and Kato, H. (1992) cDNA cloning and expression of rat tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *J. Biochem.* **111**, 681-687.
- [17] Bajaj, M.S., Kuppuswamy, N.N., Saito, H., Spitzer, S.G. and Bajaj, S.P. (1990) Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: Evidence that endothelium is the principle site of its synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8869-73.
- [18] Bajaj, M.S. and Bajaj, S.P. (1997) Tissue factor pathway inhibitor: potential therapeutic applications. *Thromb. Haemost.* **78**, 471-477.
- [19] Werling, R.W., Zacharski, L.R., Kisiel, W., Bajaj, S.P., Memoli, V.A. and Rousseau, S.M. (1993) Distribution of tissue factor pathway inhibitor in normal and malignant human tissue. *Thromb. Haemost.* **69**, 366-369.
- [20] Brinkmann, T., Kaehnert, H., Prohaska, W., Nordfang, O. and Kleesiek, K. (1994) Synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human synovial cells and chondrocytes makes joints the predilected site of bleeding in haemophiliacs. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **32**, 313-317.
- [21] Bajaj, M.S., Kuppuswamy, M.N., Manepalli, A.N. and Bajaj, S.P. (2000) transcriptional Expression of tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Thromb. Res.* **100**, 211-221.
- [22] Rapaport, S.I. (1991) The extrinsic pathway inhibitor. A regulator of tissue factor dependent blood coagulation. *Thromb. Haemost.* **66**, 6-15.
- [23] Novotny, W.F., Brown, S.G., Miletich, J.P., Rader, D.J. and Broze, G.J.Jr. (1991) Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood.* **78**, 387-393.
- [24] Sandset, P.M., Hellgren, M., Uvebrandt, M. and Bergstrom, H. (1989) Extrinsic coagulation pathway inhibitor and heparin cofactor II during normal and hypertensive pregnancy. *Thromb. Res.* **55**, 665-670.
- [25] Warr, T.A., Warn, C.B., Cramer, B.J., Rao, L.V. and Rapaport, S.I. (1989) Human plasma extrinsic pathway inhibitor activity: I. Standardization of assay and evaluation of physiologic variables. *Blood.* **74**, 201-206.
- [26] Palmier, M.O., Hall, L.J., Reisch, C.M., Baldwin, M.K., Wilson, A.G. and Wun, T.C. (1992) Clearance of recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in rabbits. *Thromb. Haemost.* **68**, 33-36.

- [27] Broze, G.J.Jr. (1998) Tissue factor pathway inhibitor gene disruption. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. **9** (Suppl.1), 89-92.
- [28] Llobet, D., Falkon, L., Mateo, J., Vallve, C., Martinez, E., Fontcuberta, J. and Borrel, M. (1995) Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in two out of three members of a family with thrombophilia. *Thromb. Res.* **80**, 418-419.
- [29] Kamikura, Y., Wada, H., Yamada, A., Shimura, M., Hiyoyama, K., Shiku, H., Tanigawa, M., Nishikawa, H., Yamada, N., Iska, N., Nakano, T., Kumeda, K. and Kato, H. (1997) Increases tissue factor pathway inhibitor in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Haematol.* **55**, 183-187.
- [30] Callander, N.S., Rao, L.V., Nordfang, O., Sandset, P.M., Warn-Cramer, B. and Rapaport, S.I. (1992) Mechanism of binding of recombinant extrinsic pathway inhibitor (rEPI) to cultured cell surfaces. Evidence that rEPI can bind and inhibit factor VIIa-tissue factor complex in the absence of factor Xa. *J. Biol. Chem.* **267**, 876-882.
- [31] Girard, T.J. (1997) Tissue factor pathway inhibitor. In: Novel therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis. Sasahara, A. and Lasclazo, J. (eds.) Marcel Decker, New York, 225-260.
- [32] Lindahl, A.K., Sandset, P.M., Abilgaard, U., Andersson, T.R. and Harbitz, T.B. (1989) High plasma level of extrinsic pathway inhibitor and low levels of other coagulation inhibitors in advanced cancer. *Acta Chir. Scand.* **155**, 389-393.
- [33] Gouin-Thibault, I., Achkar, A. and Samama, M.M. (2001) The thrombophilic state in cancer patients. *Acta Haematol.* **106**, 33-42.
- [34] Iversen, N., Lindahl, A.K. and Abilgaard, U. (1998) Elevated TFPI in malignant disease: relation to cancer type and hypercoagulation. *Brit. J. Haematol.* **102**, 889-895.
- [35] Zhang, Y., Deng, Y., Luther, T., Mueller, M., Ziegler, R., Waldherr, R., Stern, D.M. and Nawroth, P.P. (1994) Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **94**, 1320-27.
- [36] Kleesiek, K., Schmidt, M., Goetting, C., Brinkmann, T. and Prohaska, W. (1998) A first mutation in the human tissue factor pathway inhibitor gene encoding [P151L]TFPI. *Blood.* **92**, 3976-80.
- [37] Kleesiek, K., Schmidt, M., Goetting, C., Schwenz, B., Lange, S., Mueller-Berghaus, G., Brinkmann, T. and Prohaska, W. (1999) The 536C→T transition in the human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene is statistically associated with a higher risk for venous or arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* **82**, 1-5.
- [38] Moatti, D., Seknadij, P., Galand, C., Poirier, O., Fumeron, F., Desprez, S., Garbaz, M., Dhermy, D., Arveiler, D., Evans, A., Luc, G., Ruidavets, J.B., Ollivier, V., Hakim,

- J., Aumont, M.C. and de Post, D. (1999) Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene in patients with acute coronary syndromes and in healthy subjects. Impact of the V264M substitution on plasma levels of TFPI. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 862-69.
- [39] Miyata, T., Sakata, T., Kumeda, K., Uchida, K., Tsushima, M., Fujimura, H., Kawasaki, T. and Kato, H. (1998) C339T polymorphism in the promotor region of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene does not change the plasma TFPI antigen level and does not cause venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* **78**, 483-488.
- [40] Driancourt, M.-A., Gougeon, A., Royère, D. and Thibault, C. (1993) Ovarian function. In: Thibault, C., Levasseur, M.C. and Hunter, R.H.F. eds. *Reproduction in mammals and man*. Paris, Ellipses, p. 281-305.
- [41] Greenwald, S.G. and Terranova, P.F. (1998) Follicular selection and its control. In: Kobil E, Neill J *et al.* eds. *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press. 387-445.
- [42] Gentry, P.A., Plante, L., Schroeder, O.B., LaMarre, J., Young, J.E. and Dodds, W.G. (2000) Human ovarian fluid has functional systems for the generation and modulation of thrombin. *Fertil. Steril.* **73**, 848-854.
- [43] Shimada, H., Kasakura, S. and Shiotani, M. (2001) Hypocoagulable state of human preovulatory ovarian follicular fluid: Role of sulfated proteoglycan and tissue factor pathway inhibitor in the fluid. *Biol. Reprod.* **64**, 1739-45.
- [44] Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H.-R., Brinkmann, T. and Kleesiek, K. (2002) High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 1079-86.
- [45] Thyzel, E. (2003) Quantification of TFPI in human seminal plasma and human follicular fluid. *Thromb. Res.* **109**: 329-332.
- [46] Van Wersch, J.W.J., De Vries-Hanje, J.C. and Ubachs, J.M.H. (1992) Coagulation and fibrinolysis markers in seminal plasma of patients under evaluation for involuntary childlessness. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **30**, 467-471.
- [47] Fernandez, J.A., Heeb, M.J., Radtke, K.-P. and Griffin, J.H. (1997) Potent blood coagulant activity of human semen due to prostasome-bound tissue factor. *Biol. Reprod.* **56**, 757-763.
- [48] Mann T. (1964) *The biochemistry of semen and the male reproduction tract*. New York, Wiley.
- [49] Malinow, M.R. (1995) Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: A mini review. *Clin. Chem.* **41**, 173-176.

- [50] Ueland, P.M. (1995) Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin. Chem.* **41**, 340-342.
- [51] Finkelstein, J.D. (1990) Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* **1**, 228-237.
- [52] Stryer, L. (1996) Biochemie, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 4. edition.
- [53] Skovby T, Kraus P. The homocysteinurias. In: *Connective tissue and its heritable disease*. Wiley-Liss. 2002; pp 627-650.
- [54] Mudd, S.H., Levy, H.L. and Skovby, F. (1995) Disorders of transsulfuration. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., *et al.*, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 1279-1327,
- [55] den Heijer, M., Koster, T., Blom, H.J., Bos, G.M., Briet, E., Reitsma, P.H., Vandenbroucke, J.P. and Rosendaal, F.R. (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **334**, 759-762.
- [56] Wald, D.S., Law, M. and Morris, J.K. (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *B.M.J.* **325**, 1202-06.
- [57] den Heijer M., Rosendaal, F.R., Blom, H.J., Gerrits, W.B.J. and Bos, G.M.J. (1998) Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: A meta-analysis. *Thromb. Haemost.* **80**, 874-877.
- [58] Welch, G.N. and Loscalzo, J. (1998) Homocysteine and Atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1042-50.
- [58] Stampfer, M.J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Newcomer, L.M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P.V. and Hennekens, C.H. (1992) A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *J.A.M.A.* **19**, 877-881.
- [59] Ridker, P.M., Manson, J.E., Buring, J.E., Shih, J., Matias, M. and Hennekens, C.H. (1999) Homocysteine and risk of cardiovascular disease among postmenopausal women. *J.A.M.A.* **19**, 1817-21.
- [60] Stapler, S.P., Marcell, P.D., Podell, E.R., Allen, R.H., Savage, D.G. and Lindenbaum, J. (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Invest.* **81**, 466-474.
- [61] Kang, S.S., Wong, P.W.K. and Norusis, M. (1987) Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism.* **36**, 458-462.
- [62] Chambers, J.C., Ueland, P.M., Obeid, O.A., Wrigley, J., Refsum, H. and Kooner, J.S. (2000) Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: An effect

- mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*. **102**, 2479-83.
- [63] Peeters, A.C., van der Molen, E.F., Blom, H.J. and den Heijer, M. (2004) The effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of endothelial dysfunction. *Thromb. Haemost.* **92**, 1086-91.
- [64] Klerk, M., Verhoef, P., Verbruggen, B., Schouten, E.G., Blom, H.J., Bos, G.M.J. and den Heijer, M. (2002) Effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of clotting activation. *Thromb. Haemost.* **88**, 230-235.
- [65] Fryer, R.H., Wilson, B.D., Gubler, D.B., Fitzgerald, L.D. and Rodgers, G.M. (1993) Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* **13**, 1327-33.
- [66] Khajuria, A. and Houston, D.S. (2000) Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. *Blood*. **96**, 966-972.
- [67] Stühlinger, M.C., Oka, R.K., Graf, E.E., Schmölzer, I., Upson, B.M., Kapoor, O., Szuba, A., Malonow, R., Wascher, T.C., Pachinger, O. and Cooke, J.P. (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia. *Circulation*. **108**, 933-938.
- [68] Salonen, E., Saksela, O., Vartio, T., Vaheri, A., Nielsen, L., Zeithen, J. (1985) Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem*. **260**, 12302-307.
- [69] Kolset, S.O., Prydz, K., Pejler, G. (2004) Intracellular proteoglycans. *Biochem J*. **379**, 217-227.
- [70] Thyzel, E., Siegling, S., Brinkmann, T., Kleesiek, K., Gotting, C. (2006) Expression and characterization of wild-type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect cells. *Mol Cell Biochem*. **283**, 31-38.
- [71] Leneham, J.G., Frye S. Jr., Phillips, G.E. (1966) Use of the activated partial thromboplastin time in the control of heparin administration. *Clin Chem*. **12**, 263-268.
- [72] Zucker, S., Cathey, M.H. (1969) Control of heparin therapy. Sensitivity of the activated partial thromboplastin time for monitorin the antithrombotic effects of heprain. *J Lab Clin Med*. **73**, 320-326.
- [73] Polak, B., Daunter, B. (1989) Seminal plasma biochemistry: IV. Enzymes involved in the liquefaction of human seminal plasma. *Int J Androl*. **12**, 187-194.
- [74] Mandal, A., Batabyal, S.K., Bhattacharyya, A.K. (1989) Glycerylphosphorylcholine levels in the coagulational groups of seminal plasma. *Ind J Med Res*. **90**, 186-190.

- [75] Lilja, H., Laurell, C.B. (1984) Liquefaction of coagulated human semen. *Scand J Clin Lab Invest.* **44**, 447-452.
- [76] Lilja, H., Laurell, C.B. (1985) The predominant protein in human seminal coagulate. *Scand J Clin Lab Invest.* **45**, 635-641.
- [77] Mandal, A., Bhattacharyya, A.K. (1987) Relationship between the coagulation-liquefaction property of human ejaculates and their volume, sperm count and motility. *Clin Reprod Fertil.* **5**: 367-371.
- [78] Rogolino, A., Coccia, M.E., Fedi S. (2003) Hypercoagulability, high tissue factor and low tissue factor pathway inhibitor levels in severe ovarian hyperstimulation syndrome: possible association with clinical outcome. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **14**, 277-282.
- [79] Thyzel, E., Siegling, S., Tinneberg, H-R., Gotting, C., Kleesiek, K. (2005) Age dependant assessment of TFPI levels in follicular fluid of women undergoing IVF. *Clin Chim Act.* **361**, 176-181.
- [80] Enskog, A., Henriksson, M., Unander, M., Nilsson, L., Brannstrom, M. (1999) Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* **71**, 808-814.
- [81] Delvigne, A., Demoulin, A., Smitz, J. (1993) The ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a Belgian multicentric study. Clinical and biological features. *Hum Reprod.* **8**, 1353-60.
- [82] Rizk, B., Smitz, J. (1992) Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRh agonists for IVF and related procedures. *Hum Reprod.* **7**, 320-327.
- [83] Thyzel, E., Siegling, S., Gotting, C., Kleesik, K. (2005) Elevated TFPI levels in female hyperhomocysteinemic patients. *Clin Biochem.* **38**, 1038-40.
- [84] Ueland, P.M., Refsum, H., Brattström, L. (1992) Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Fransis, R.B.J., (editor) *Atherosclerotic disease, hemostasis, and endothelial function*. New York: Marcel Dekker; pp 183-236.
- [85] Lew, R., Komesaroff, P., Williams, M., Dawood, T., Sidhir, K. (2003) Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. *Circ Res.* **93**, 1127-33.
- [86] Sandset, P.M., Abilgaard, U., Larsen, M.L. (1988) Heparin induces release of intrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res.* **50**: 803-813.
- [87] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263.
- [88] Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- [89] Wang, K., Koop, B.T. and Hood, L. (1994) A simple method using T4 DNA polymerase to clone polymerase chain reaction products. *Biotechniques* **17**, 236-238.
- [90] Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513.
- [91] Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.) (1991) PCR-protocols, a guide to methods and applicaitons. Academic Press, San Diego, USA.
- [92] Sanger, F., Nickler, S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-67.
- [93] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provencano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 75-85.
- [94] Lottspeich, F. and Zorbes, H. (Hrsg.), Bioanalytik, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verlag (1998).
- [95] Tardy-Poncet, B., Tardy, B., Laporte, S., Mismetti, P., Amiral, J., Piot, M., Reynaud, J., Campos, L. and Decousus, H. (2003) Poor anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor in patients with venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 507-510.
- [96] Caplice, N.M., Panetta, C., Peterson, T.E., Kleppe, L.S., Mueske, C.S., Kostner, G.M., Broze, G.J.Jr. and Simari, R.D. (2001) Lipoprotein(a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood.* **98**, 2980-2987.
- [97] Gültekin, H. and Heermann, K.H. (1988) The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329.
- [98] Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *Biophys. Biochem. Methods.* **10**, 203-209.
- [99] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

10. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

1. **Thyzel E**, Kohli S, Siegling S, Prante C, Kleesiek K, Götting C (2006) Relative quantification of glycosaminoglycan induced upregulation of TFPI-mRNA expression in-vitro. *Thromb Res.* (under revision)
2. **Thyzel E**, Siegling S, Brinkmann T, Kleesiek K, Götting C (2006) Expression and characterization of wild type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect cells. *Mol Cell Biochem.* 2006; **283** (1-2): 31-38.
3. Siegling S, **Thyzel E**, Glahn J, Kleesiek K, Götting C (2006) Analysis of sequence variations in the promoter region of the human tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) gene in apoplectic patients and blood donors. *Annals of Hematology.* 2006; **85**: 32-37.
4. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Kleesiek K (2005) Elevated TFPI levels in female hyperhomocysteinemic patients. *Clin Biochem.* 2005; **38**: 1038-40.
5. **Thyzel E**, Siegling S, Tinneberg H-R, Götting C, Kleesiek K (2005) Age dependent assessment of TFPI levels in women undergoing IVF. *Clin Chim Acta.* 2005; **361**: 176-181.
6. Siegling S, **Thyzel E**, Brinkmann T, Prohaska W, Götting C, Kleesiek K, Glahn J (2004) Genetic variations in the human TFPI-2 gene and its promotor region by denaturing high performance liquid chromatography. *Thromb Res.* 2004; **113**: 341-343.
7. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Quantification of tissue factor pathway inhibitor in human seminal plasma and in human follicular fluid. *Thromb Res.* 2003; **109**: 329-332.

Preise & Stipendien:

1. Promotionsstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V., Sankt Augustin
2. Best-Abstract-Preis der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) für Nachwuchswissenschaftler, Innsbruck, Österreich, Februar 2003

Vorträge:

1. Heparin-induced upregulation of TFPI-mRNA expression in human endothelial cells in-vitro. 49th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Mannheim, Germany, Feb. 2005

Kongressbeiträge:

1. Kleesiek K, **Thyzel E**, Siegling S, Götting C (2005) Hyperhomocysteinemia and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) levels: A comparison between men and women. XIX. International Congress of Clinical Chemistry, IFCC/AACC Annual Meeting 2005, Orlando, Florida, USA (24.-28. Juli 2005).
2. Kleesiek K, **Thyzel E**, Kohli S, Siegling S, Götting C (2005) Heparin-induced upregulation of TFPI-mRNA expression in human endothelial cells *in vitro*. 16th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab 2005); Glasgow, UK. *Clin Chim Act.* **355**, Suppl., S288: TP4.15.
3. Siegling S, **Thyzel E**, Götting C, Kleesiek K (2005) TFPI-2 Promotor: Analysis of sequence variations. 49th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Mannheim, Germany, Feb. 2005. *Hämostaseologie.* **16**, V22.
4. **Thyzel E**, Kohli S, Siegling S, Götting C, Kleesiek K (2005) Heparin-induced upregulation of TFPI mRNA expression in human endothelial cells *in-vitro*. 49th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Mannheim, Germany, Feb. 2005. *Hämostaseologie.* **15**, V20.
5. **Thyzel E**, Siegling S, Tinneberg H, Götting C, Kleesiek K (2005) Determination of TFPI concentrations in *liquor folliculi* of OHSS patients during *in-vitro* fertilization. 49th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Mannheim, Germany, Feb. 2005. *Hämostaseologie.* **68**, P94.
6. Siegling S, **Thyzel E**, Götting C, Kleesiek K (2004) TFPI-2 Promotor Region: Detection of Sequence Variations by DHPLC. Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, November 2004, Düsseldorf, Germany. *Clin Chem Lab Med.* **42**: A128.
7. **Thyzel E**, Siegling S, Kohli S, Götting C, Kleesiek K (2004) Elevated levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in women suffering from hyperhomocysteinemia. Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, November 2004, Düsseldorf, Germany. *Clin Chem Lab Med.* **42**: A131.
8. Siegling S, **Thyzel E**, Götting C, Kleesiek K (2004) Detection of genetic variations in the human Tissue Factor Pathway Inhibitor 2 gene (TFPI-2) and its promotor region by DHPLC in apoplex patients. 48th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Hamburg, Germany, Feb. 2004. *Hämostaseologie.* **24**: V 31.
9. **Thyzel E**, Siegling S, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Götting C, Kleesiek K (2004) Decreased levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in plasma of women undergoing *in-vitro* fertilization. 48th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Hamburg, Germany, Feb. 2004. *Hämostaseologie.* **24**: P149.
10. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human reproductive fluids. EUROMEDLAB 2003, 15th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1 - 5 June 2003, Barcelona, Spain. *Clin Chem Lab Med.* **41**; Special Suppl., 134.

11. Brinkmann T, **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Tinneberg H-R, Kleesiek K (2003) Decreased TFPI levels in seminal plasma of infertile men. AACC 2003, Annual Meeting and Clinical Lab Expo, July 20-24, 2003, Philadelphia, Pennsylvania, USA. *Clin Chem.* **49**, No. 6 Suppl., A3-A4.
12. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Expression of wild type tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and the first natural TFPI mutant ([P151L]) in insect and mammalian cells. XIX. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, Jul. 2003.
13. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human seminal plasma and in human ovarian follicular fluid. XIX. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, Jul. 2003.
14. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Quantification in human seminal plasma and in human ovarian follicular fluid. 47th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Innsbruck, Austria, Feb. 2003. *Annals of Hematology.* **82**, Suppl.1, 85.
15. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2003) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Expression of wild type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect and mammalian cells. 47th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) e.V., Innsbruck, Austria, Feb. 2003. *Annals of Hematology.* **82**, Suppl. 1, 85. Best-Abstract-Preis
16. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2002) Expression of wild type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect and mammalian cells. Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, Germany, Nov. 2002. *J Lab Med.* **26**, 506.
17. **Thyzel E**, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2002) Quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human seminal plasma and in human ovarian follicular fluid. Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, Germany, Nov. 2002. *J Lab Med.* **26**, 506.
18. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2002) Insect and mammalian cells as a new and efficient model system for the expression of wild type TFPI and the [P151L]TFPI mutant. Annual Meeting of the Austrian Societies of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Salzburg, Austria, Sep. 2002. *Wiener Klinische Wochenschrift.* **114**, Suppl.4, 24.
19. **Thyzel E**, Siegling S, Götting C, Brinkmann T, Kleesiek K (2002) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Quantification of TFPI concentrations in human reproductive fluids. Annual Meeting of the Austrian Societies of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Salzburg, Austria, Sep.2002. *Wiener Klinische Wochenschrift.* **114**, Suppl.4, 11.
20. Siegling S, **Thyzel E**, Brinkmann T, Götting C, Kleesiek K (2002) Molecular cloning of TFPI mutants: First expression of [P151L]TFPI in insect cells. 46th Annual Meeting, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Erfurt, Germany, Feb. 2002. *Annals of Hematology.* **81**, Suppl. 1, 79.