

***Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-1 und -2:***  
**Analyse von Sequenzvariationen und ihre**  
**pathobiochemische Bedeutung**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Sabine Siegling**

Bad Oeynhausen / Bielefeld

Juni 2005



1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2005

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. med. Knut Kleesiek

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,

Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,

Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum,

in Bad Oeynhausen.

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Knut Kleesiek für das interessante und vielfältige Promotionsthema und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

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

Herrn Dr. Christian Götting danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die gute Betreuung der Arbeit.

Frau Sandra Müller, Frau Manuela Schöttler und Herrn Elmar Thyzel danke ich für viele hilfreiche Ratschläge und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Joachim Kuhn, Herrn Dr. Michael Schmidt und Herrn Dr. Jens Dreier danke ich für viele wertvolle Anregungen.

Meinen Kollegen Frau Sylvia Schön, Frau Doris Hendig, Frau Veronika Schulz und Herrn Christian Prante danke ich für eine sehr schöne Laborzeit. Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Alexandra Adam und Marlen Ewald, bedanken für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial danke ich Herrn Professor Dr. Otto Busse und Herrn Dr. Joerg Glahn, Klinik für Neurologie, Klinikum Minden, Minden.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Tochter und bei „der Familie“ bedanken für ihre Unterstützung.

*Für Andreas und Carlotta*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
2.1. Die Serinproteinase-Inhibitoren TFPI-1 und TFPI-2	2
2.2. <i>Tissue factor pathway inhibitor-1</i>	2
2.2.1. Das TFPI-1-Gen und seine Promotorregion	3
2.2.2. Polymorphismen im TFPI-1-Genom	4
2.2.3. Physiologie und Pathobiochemie von TFPI-1	5
2.3. <i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>	8
2.3.1. Das TFPI-2-Gen und seine Promotorregion	9
2.3.2. Polymorphismen im TFPI-2-Genom	10
2.3.3. Physiologie und Pathobiochemie von TFPI-2	10
2.4. Das Herz- Kreislaufsystem und seine Erkrankungen	11
2.4.1. Schlaganfall und seine Entstehung	12
2.5. Zielsetzung der Arbeit	14
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>15</b>
3.1. Klonierung und Expression des WT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante	15
3.1.1. Synthese und Klonierung der humanen TFPI-1-cDNA	16
3.1.2. Mutagenese der humanen WT-TFPI-1-cDNA	17
3.1.3. Klonierung des WT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante	17
3.1.3.1. Klonierung in den Expressionsvektor pSec Tag2/HygroA	17
3.1.3.2. Klonierung in den Expressionsvektor pMIB-V5-HisC	18
3.1.4. Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante in Säugierzellen	19
3.1.4.1. Nachweis im <i>Dot-Blot</i> -ELISA	20
3.1.4.2. Quantitativer Gesamt-TFPI-1 Nachweis	21
3.1.5.3. Quantitative Bestimmung der TFPI-1-Aktivität	21
3.1.5. Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante in Insektenzellen	21
3.1.5.1. Nachweis im <i>Dot-Blot</i> -ELISA	21
3.1.5.2. Quantitativer Gesamt-TFPI-1 Nachweis	22

---

3.1.5.3. Quantitative Bestimmung der TFPI-1-Aktivität	23
<b>3.2. Klonierung des WT-TFPI-2 und Expression in Säuger- und Insektenzellen</b>	<b>24</b>
3.2.1. Klonierung in den Vektor pSec <i>Tag2</i> /HygroA	25
3.2.2. Klonierung in den Vektor pMIB-V5-HisC	25
3.2.3. Expression des rWT-TFPI-2 in Säuger- und Insektenzellen	26
3.2.3.1. Nachweis des rWT-TFPI-2 im <i>Western Blot</i>	26
<b>3.3. Funktionelle Untersuchung des rekombinanten WT-TFPI-2</b>	<b>28</b>
3.3.1. Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 mittels reverser Zymografie	28
3.3.2. Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 im chromogenen Substrattest	29
3.3.3. Modifizierte PTT: Nachweis der antikoagulatorischen Aktivität des rWT-TFPI-2	31
<b>3.4. Untersuchung der TFPI-Gene auf genetische Variationen mittels DHPLC</b>	<b>33</b>
3.4.1. Untersuchung von juvenilen Apoplex-Patienten auf Risikofaktoren für venöse Thrombose und Myokardinfarkt	33
3.4.2. Untersuchung von Patienten nach <i>Stent</i> -Implantation auf Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt und Restenose	34
3.4.3. Etablierung der DHPLC-Analysebedingungen	39
3.4.4. Untersuchung des TFPI-1-Gens mittels DHPLC in Apoplex-Patienten	40
3.4.5. Untersuchung des TFPI-2-Gens mittels DHPLC in Apoplex-Patienten und Patienten nach <i>Stent</i> -Implantation	41
<b>3.5. Analyse der Promotorregion des humanen TFPI-2-Gens</b>	<b>42</b>
3.5.1. Nachweis von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens in Apoplex-Patienten und Blutspendern	42
3.5.2. Nachweis von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens in Patienten nach <i>Stent</i> -Implantation	45
3.5.3. Untersuchung der TFPI-2-Promotorregion auf Bindungstellen für humane Transkriptionsfaktoren	47
3.5.4. Klonierung und Mutagenese des WT-TFPI-2-Promotorfragments	48
3.5.4.1. Klonierung in den Vektor pSEAP2- <i>Basic</i>	49
3.5.4.2. Mutagenese des WT-TFPI-2-Promotorfragments	50
3.5.5. Untersuchung von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens auf die transkriptionelle Aktivität	50

---

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>52</b>
4.1.	Untersuchung der rekombinant exprimierten TFPI-1, -2 und der [P151L]TFPI-1-Mutante	52
4.2.	Untersuchung der TFPI-Gene auf genetische Variationen	54
4.3.	Analyse der Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens	55
4.4.	Ausblick	58
<b>5.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>60</b>
<b>5.1.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>60</b>
5.1.1.	Nukleinsäureextraktion	60
5.1.1.1.	Plasmidisolierung aus Bakterien	60
5.1.1.2.	Isolierung von genomischer DNA aus EDTA-Vollblut	60
5.1.1.3.	Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	61
5.1.2.	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	61
5.1.3.	Agarosegel-Elektrophorese	62
5.1.4.	Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	62
5.1.5.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	62
5.1.6.	Polymerase-Kettenreaktion	63
5.1.7.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten	63
5.1.8.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	64
5.1.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	64
5.1.10.	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem <i>TOPO TA Cloning Kit</i>	64
5.1.11.	<i>Site-directed</i> Mutagenese	65
5.1.12.	DNA-Sequenzierung	66
5.1.13.	Mutationsanalyse mittels DHPLC	67
<b>5.2.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>68</b>
5.2.1.	Kultivierung von Bakterien	68
5.2.1.1.	Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur und auf Festmedien	68
5.2.1.2.	Kultivierung von Bakterien in einer Glycerinkultur	68
5.2.1.3.	Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli TOP 10</i> -Zellen	69
5.2.1.4.	Transformation von <i>E. coli XL 10-Gold</i> -Zellen	69
5.2.2.	Kultivierung von humanen und tierischen Zellen	69
5.2.2.1.	Kultivierung von verschiedenen eukaryotischen Zellen	69
5.2.2.2.	Transfektion von eukaryotischen Zellen	70
5.2.2.3.	Kultivierung von <i>High Five</i> -Insektenzellen	71
5.2.2.4.	Transfektion von <i>High Five</i> -Insektenzellen	71

---

5.2.2.5. Anlegen einer Rollerkultur von stabil transfizierten <i>High Five</i> -Zellen	72
5.2.2.6. Kryokonservierung von Insektenzellen	72
<b>5.3. Proteinchemische Methoden</b>	<b>72</b>
5.3.1. Aufkonzentrieren von Zellkulturüberstand	72
5.3.2. Proteinnachweis mittels <i>Western-Blot</i>	72
5.3.3. <i>Dot-Blot</i>	74
5.3.4. Chromogener TFPI-Aktivitätstest	74
5.3.5. Gesamt-TFPI Nachweis	75
5.3.6. Quantitative Bestimmung von PSA ( <i>Prostate-specific antigen</i> )	75
5.3.7. Nachweis inhibitorischer Aktivität durch reverse Zymografie	75
5.3.8. BCA-Test für die Bestimmung der Proteinkonzentration	76
5.3.9. Modifizierte PTT	76
5.3.10. Chromogener Substrattest: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von TFPI-2	77
5.3.11. SEAP-Chemilumineszenztest	78
<b>6. MATERIAL &amp; GERÄTE</b>	<b>80</b>
6.1. Bakterienstämme	80
6.2. Zelllinien	80
6.3. Zellkulturmedien	81
6.4. Plasmide	81
6.5. Patienten und Vergleichskollektive	83
6.6. Längen- und Größenstandards	83
6.7. Oligonukleotide (Primer)	84
6.8. DHPLC-Analyseparameter	87
6.9. Chemikalien und Reagenzien	89
6.10. Reagenziensätze	91
6.11. Puffer und Lösungen	91
6.12. Sonstige Materialien	92
6.13. Geräte	92
6.14. <i>Software</i> und Datenbanken	93
<b>7. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>94</b>
<b>8. LITERATUR</b>	<b>98</b>
<b>9. PUBLIKATIONEN &amp; PRÄSENTATIONEN</b>	<b>107</b>

# 1 Zusammenfassung

*Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI)-1 und -2 sind Serinproteinase-Inhibitoren, die zur *Kunitz*-Typ-Familie gehören. Während die Funktion für TFPI-1 als zentraler Inhibitor des exogenen Weges der Blutgerinnung bekannt ist, ist die physiologische Bedeutung von TFPI-2 weiterhin unklar. Eine Beteiligung an Tumorinvasion, inflammatorischen Prozessen und Arteriosklerose wird vermutet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Klonierung der WT-TFPI-1-, [P151L]TFPI-1- und der WT-TFPI-2-cDNA gezeigt werden und es gelang die rekombinante Darstellung in einem COS-1-Säugerzell- und einem *High Five*-Insektenzell-Expressionsystem. Die Konzentration und die inhibitorische Aktivität des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante konnte im Gesamt-TFPI-ELISA und im chromogenen TFPI-Aktivitätstest quantitativ bestimmt werden. Die inhibitorische Aktivität des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von COS-1- und *High Five*-Zellen wurde mit einer verminderten Chymotrypsin-Aktivität von 31% und 62% gezeigt. Eine antikoagulatorische Wirkung für rWT-TFPI-2 konnte mit einer modifizierten partiellen Thromboplastinzeit nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte die Methode der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatografie (DHPLC) für die TFPI-Gene etabliert werden. Es wurden juvenile Patienten nach ischämischem Schlaganfall (Apoplex) und Patienten nach einer *Stent*-Implantation auf krankheitsassoziierte Polymorphismen untersucht. Für beide Gene konnten Sequenzvariationen in den flankierenden Intronabschnitten detektiert werden, aber keine neuen SNPs (*single nucleotide polymorphism*) in den kodierenden Regionen. Erstmals konnten 7 neue Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A, und -18C>A in der Promotorregion des TFPI-2-Gens in juvenilen Apoplex-Patienten und Blutspendern identifiziert werden. Zwei Sequenzvariationen -546C>T und -18C>A sind in möglichen Bindungsstellen für die humanen Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp-1 lokalisiert. Mit einem Promortestsystem konnte der Einfluss der detektierten Sequenzvariationen auf die transkriptionelle Aktivität untersucht werden. Für die Analyse wurde das WT-TFPI-2-Promotorfragment (716 bp) stromaufwärts vom Translationsstart in einen *secreted alkaline phosphatase* (SEAP)-Expressionsvektor ohne eukaryotischen Promotor und *Enhancer* kloniert. Die Sequenzvariationen konnten mit gerichteter Mutagenese eingeführt werden. HEK-293-Zellen wurden mit dem Plasmid pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-PF und mit Plasmiden, die einen Nukleotidaustausch in der cDNA des WT-TFPI-2-Promotorfragments enthalten, transfiziert. Die SEAP-Expressionsrate im Zellkulturüberstand wurde bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität der getesteten Mutanten 1,3-2,8-fach reduziert war im Vergleich mit dem Wildtyp ( $p < 0,05$ ). Die Variation -18C>A, lokalisiert in einer möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstelle für Sp-1, zeigte den größten Effekt auf die transkriptionelle Promotoraktivität.

## 2 Einleitung

### 2.1. Die Serinproteinase-Inhibitoren TFPI-1 und TFPI-2

Proteinaseinhibitoren binden im Plasma und im Gewebe Proteinase und inaktivieren diese, indem sie die Proteolyse des Substrates verhindern. Sie werden in Abhängigkeit vom aktiven Zentrum der Proteinase in fünf verschiedene Klassen eingeteilt: 1) Serin-Proteinase mit Serin und Histidin im aktiven Zentrum, 2) Cystein-Proteinase mit Cystein im aktiven Zentrum, 3) Aspartat-Proteinase mit einer Aspartatgruppe im aktiven Zentrum, 4) Metallo-Proteinase mit Metallionen (z.B.  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) im aktiven Zentrum und Enzyme mit noch unbekannter Reaktionsseite (Barrett, 1994). Proteinase sind beteiligt an allen biochemischen Prozessen, hierzu zählen unter anderem die Blutgerinnung, die Fibrinolyse, die Blutdruckregulation und die Regulation inflammatorischer Prozesse. *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI)-1 und -2 gehören zur Gruppe der Serinproteinase-Inhibitoren. Diese Superfamilie umfasst 11 verschiedene Familien, deren Einteilung auf der ähnlichen Aminosäuresequenz, der topologischen Stellung der Disulfidbrücken und der Position des reaktiven Zentrums basiert (Laskowski *et al.*, 1980; Bode und Huber, 1992). Hierzu zählt unter anderem die *Kunitz*-Typ-Familie, zu der auch TFPI-1 und -2 gehören. Die Familienzugehörigkeit ergibt sich aus der Lage und dem Verknüpfungsmuster der drei Disulfidbrücken.

### 2.2. Tissue factor pathway inhibitor-1

TFPI-1 wurde ursprünglich als *Extrinsic pathway inhibitor* (EPI) und aufgrund seiner Assoziation mit Lipoproteinen als *Lipoprotein-associated coagulation inhibitor* (LACI) bezeichnet (Broze und Miletich, 1987; Warn-Cramer *et al.*, 1987). Erst im Jahre 1991 einigte sich die Standardisierungskommission der *International Society on Thrombosis and Haemostasis* auf den Namen TFPI.

TFPI-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen und in geringeren Mengen von Megakaryozyten, Monozyten, Fibroblasten und Synovialzellen synthetisiert (Bajaj *et al.*, 1990; Novotny *et al.*, 1988; van der Logt *et al.*, 1994; McGee *et al.*, 1994; Brinkmann *et al.*, 1994). Im Humanplasma kommt TFPI-1 in sehr geringen Konzentrationen (2,5 nmo/l) vor (Novotny *et al.*, 1991).

Ein kleiner Teil des TFPI-1 liegt in freier Form (~5-10%) vor, während der größte Teil an Lipoproteine gebunden ist, davon sind ~50% an VLDL und LDL und ~45% an HDL gebunden. TFPI-1 kann *in vitro* von Thrombin, Plasmin, Faktor Xa und von verschiedenen Matrixmetalloproteinase gespalten werden (Ohkura *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Salemink *et al.*, 1998; Belaaouaj *et al.*, 2000). Die cDNA umfasst 1431 bp und kodiert ein Protein mit 275 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ~42 kDa.

Auf das Signalpeptid folgt ein negativ geladener N-terminaler Teil, drei tandemartig angeordnete *Kunitz*-Typ-Domänen und ein positiv geladener C-terminaler Teil. Die erste *Kunitz*-Typ-Domäne hemmt den *Tissue factor* (TF)-Faktor VIIa-Komplex und die zweite Faktor Xa. In der C-terminalen Region und der dritten Domäne sind Heparinbindungsstellen enthalten. Die Funktion der Domäne ist noch nicht eindeutig geklärt, möglicherweise spielt sie eine Rolle bei der Lokalisierung von TFPI- $\alpha$  an der Zelloberfläche (Piro und Broze Jr, 2004). Endothelzellen produzieren zwei durch alternatives Spleißen entstandene Formen von TFPI-1 im Verhältnis von TFPI- $\beta$ /TFPI- $\alpha$  mRNA  $\sim 0,1$  bis  $0,2$ . Die TFPI- $\beta$  Form enthält einen GPI (*Glycosyl-phosphatidylinositol*)-Anker, die dritte *Kunitz*-Typ-Domäne und der C-terminale Teil von TFPI- $\alpha$  fehlt, anstelle dessen enthält es eine nicht verwandte C-terminale Aminosäuresequenz (Zhang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1999).

### 2.2.1. Das TFPI-1-Gen und seine Promotorregion

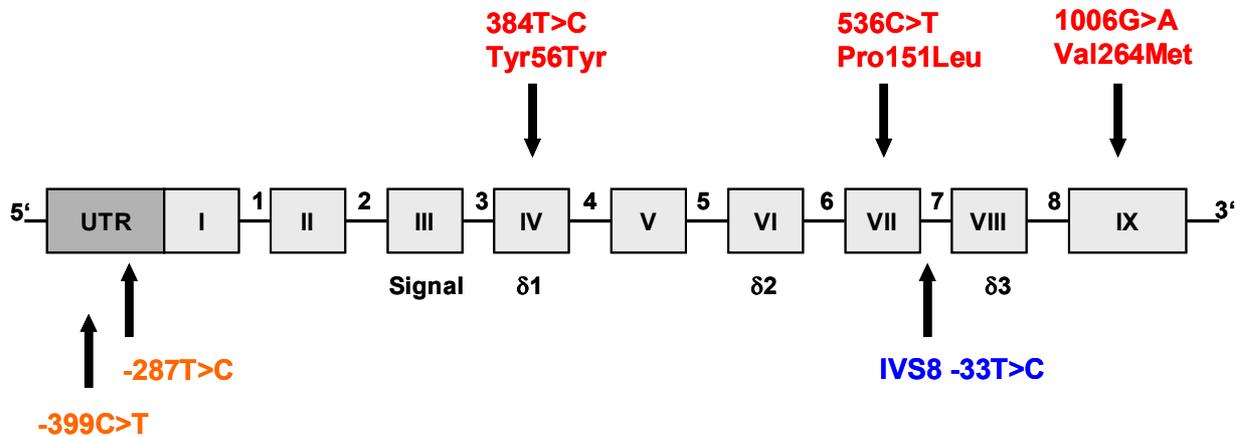
Das TFPI-1-Gen ist auf Chromosom 2q31-q32 lokalisiert und befindet sich 36 cM entfernt vom Genlokus [D2S43] und 13 cM entfernt vom Genlokus [CRYGP1] (Girard *et al.*, 1991; van der Logt, *et al.* 1992; Enjoji *et al.* 1993).

Das Gen ist  $\sim 125$  kb groß und umfasst 9 Exons und 8 Introns. Exon I und II bilden den 5'-nicht-translatierten Abschnitt des Gens. Das Signalpeptid und die N-terminale Region des TFPI-1 wird von Exon III kodiert. Die drei *Kunitz*-Typ-Domänen  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ , und  $\delta 3$  werden jeweils von einem Exon, den Exons IV, VI und VIII kodiert. Exon V und VII kodieren die Aminosäuren zwischen den *Kunitz*-Typ-Domänen und Exon IX kodiert die C-terminale Region des TFPI-1 und eine 3'-nicht-translatierte Region.

Der TFPI-1 Promotor enthält 3 major Transkriptionsstartstellen (+1, +7, +29) und 3 minor (-16, -21, -25); eine TATA Konsensussequenz fehlt (van der Logt *et al.*, 1991; Girard *et al.*, 1991; Warn-Cramer *et al.*, 1987). Zwei TGF- $\beta$  *Responseelements* (NF-1) und zwei AP-1 ähnliche Motive wurden in der 5'-flankierenden Region des TFPI-1-Gens lokalisiert (van der Logt *et al.*, 1991; Girard *et al.*, 1991; Tyson *et al.*, 1993). Des weiteren haben Promotorstudien, in einer Region 1262 bp stromaufwärts vom Translationsstart, die Anwesenheit von vier GATA-2, einer Sp1 und zwei c-Myc Bindungsmotiven identifiziert. Das GATA-2-Motiv ist wichtig für die Expression spezifischer Gene in verschiedenen Zellen (Petit *et al.*, 1999).

## 2.2.2. Polymorphismen im TFPI-1-Genom

Für das TFPI-1-Gen und seinen Promotor sind einige krankheitsassoziierte Polymorphismen beschrieben worden (Abb. 2-1).



**Abb. 2-1:** Polymorphismen des TFPI-1-Gens und seiner Promotorregion (modifiziert nach Ameziane *et al.*, 2002). Es sind Exon I-IX und Intron 1-8 dargestellt. Rot: Polymorphismen im Gen, orange: Polymorphismen in der Promotorregion, blau: Sequenzvariation im Intron, UTR: nicht-translatierte Region.

Die erste Mutation im TFPI-1-Gen wurde mittels SSCP (*single strand conformation polymorphism*)-Screening in Exon VII identifiziert (Kleesiek *et al.*, 1998; Kleesiek *et al.*, 1999). Der Nukleotidaustausch 536C>T kodiert einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an Position 151. Es wurden 342 Patienten mit venöser Thrombose untersucht, davon waren 4 Patienten heterozygot für diese Mutation. Die Patienten hatten keinen weiteren bekannten genetischen Defekt in Proteinen der Blutgerinnung (Faktor V-Leiden, Prothrombin 20210G>A, Protein C-, Protein S- und Antithrombin III-Mangel).

Von 5120 untersuchten Westfälischen Blutspendern waren 10 heterozygot für die Mutation. Die statistische Korrelation zwischen diesem Polymorphismus und einer erhöhten Thromboseneigung konnte nachgewiesen werden (*odds ratio*, 9,3; 95% Konfidenzintervall, 1,8-48,6;  $p < 0,01$ ).

Ethnologische Studien beobachteten eine höhere allelische Häufigkeit der Mutation in der Spanischen Bevölkerung (Gonzales-Conejero *et al.*, 2000; Mues *et al.*, 2002). In anderen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und venöser oder arterieller Thrombose, oder Schlaganfall in jungen Erwachsenen, erbracht werden (Hessner *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2000; Gonzales-Conejero *et al.*, 2000; Junker *et al.*, 2002).

In Exon IX wurde ein weiterer Polymorphismus (1006G>A) gefunden, der einen Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin kodiert (Moatti *et al.*, 1999).

Der Einfluss dieser Mutation auf den TFPI-Gehalt im Plasma, wurde an Patienten mit akutem koronarem Syndrom untersucht. Heterozygote Patienten (V/M) haben einen geringeren Anteil an Gesamt- und freiem TFPI-Antigen, als Wildtyp-Träger (V/V). Die TFPI-Aktivität war ebenfalls erniedrigt, aber nicht signifikant. Es konnte keine Assoziation zwischen dieser Mutation und der Erkrankung hergestellt werden. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Mutation keinen Einfluss hat auf venöse thromboembolische Erkrankungen oder Restenose nach koronarer Angioplastie (Arnaud *et al.*, 1999; Moatti *et al.*, 2001).

Ein stiller Aminosäureaustausch (Tyr56Tyr) wurde in Exon IV gezeigt (Amini-Nekoo *et al.*, 2001).

In Intron 7 wurde ein Sequenzvariation identifiziert, dessen CC-Genotyp mit einem erhöhten TFPI-Level einhergeht. Es wird vermutet, dass die Variation ein unabhängiger Schutzfaktor für eine venöser Thrombose ist (Ameziane *et al.*, 2002).

Des weiteren wurden zwei Sequenzvariationen (-399C>T und -287T>C) in der Promotorregion des TFPI-1-Gens identifiziert, die beide nicht mit venöser Thrombose assoziiert wurden (Miyata *et al.*, 1998, Moatti *et al.*, 2000).

### 2.2.3. Physiologie und Pathobiochemie von TFPI-1

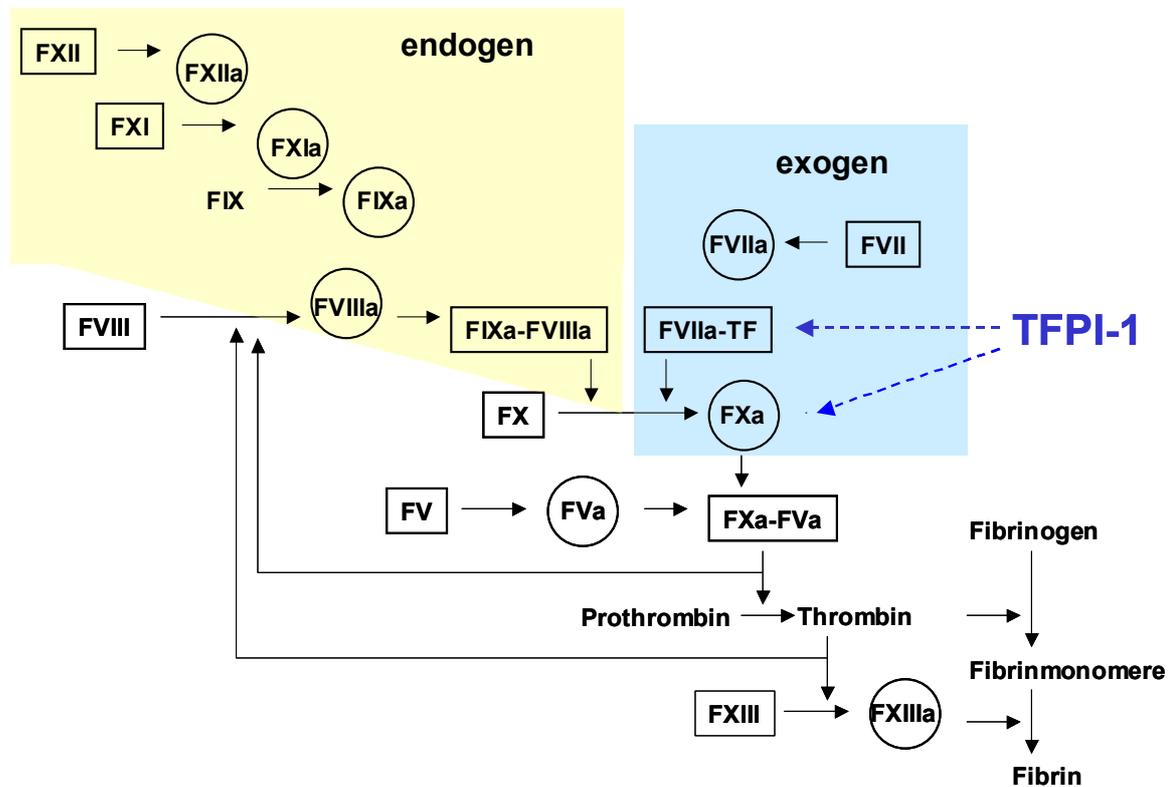
TFPI-1 ist ein zentraler Inhibitor des exogenen Weges der Blutgerinnung. Das hämostatische System erfüllt zwei physiologisch gegensätzliche Aufgaben, es wird bei Verletzungen des Gefäßsystems aktiviert, um den Blutverlust gering zu halten, andererseits wird einer überschießenden Gerinnung entgegengewirkt.

Unter physiologischen Bedingungen werden Blutgerinnung und Fibrinolyse durch das Zusammenspiel von Gefäßsystem, Thrombozyten und plasmatischem Gerinnungssystem im Gleichgewicht gehalten.

Kommt es zu einer Schädigung des Gefäßsystems laufen folgende sich gegenseitig unterstützende Reaktionsmechanismen ab: 1) Kontraktion der Arterienwand durch den direkten Verletzungsreiz und durch biogene Amine 2) Bildung eines hämostatischen Pfropfes durch Thrombozytenaggregate und 3) Entstehung eines Fibrinmaschenwerks (Thrombus) durch plasmatische Gerinnungsvorgänge.

Die Kaskaden- und die Wasserfalltheorie teilen die Blutgerinnung in einen exogenen (TF-verursachten) und einen endogenen (Kontakt-induzierten) Weg, der mit der Aktivierung von Faktor X in einem gemeinsamen Weg mündet (MacFarlane, 1964; Davie und Ratnoff, 1964).

An der Gerinnungskaskade sind 15 Faktoren beteiligt, die normalerweise in inaktiver Form vorliegen und erst nach Auslösen der Gerinnung kaskadenartig aktiviert werden, d.h. die Aktivierung erfolgt jeweils über den vorangegangenen aktivierten Faktor (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2:** Darstellung des plasmatischen Gerinnungssystems. Die inhibitorische Wirkung von TFPI-1 auf die Hämostase ist mit unterbrochenen blauen Pfeilen dargestellt. Der endogene Gerinnungsweg ist hellgelb gekennzeichnet und der exogene hellblau. F: Faktor, a: aktiviert.

Einige zentrale Reaktionen der Gerinnungskaskade laufen im Komplex aus Gerinnungsfaktoren, Kalziumionen und Phospholipiden ab. Die beteiligten Phospholipide stammen aus Thrombozyten und dienen im Komplex als Matrix, an die Gerinnungsfaktoren über Kalziumionen binden.

Der exogene Gerinnungsweg erfordert die Freisetzung von *Tissue Factor* aus geschädigten Zellen und läuft innerhalb von Sekunden ab. TF ist in der Zellmembran lokalisiert und wird nach Gewebeerletzung, Zellschädigung oder durch Expression verschiedener Zytokine oder Endotoxine freigesetzt, und bildet mit Faktor VII einen Komplex, wobei Faktor VII zu Faktor VIIa aktiviert wird. Der TF-FVIIa-Komplex aktiviert die Faktoren IX und X und löst so eine Aktivierungskaskade aus, die zur Bildung von Thrombin und schließlich Fibrin führt.

Der endogene Reaktionsweg läuft innerhalb von Minuten ab. Der Gerinnungsfaktor XII (Hageman-Faktor) wird durch den Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche (Kollagen) aktiviert und bildet zusammen mit Faktor XI und dem auf der Thrombozytenmembran haftenden Plättchenfaktor 3 einen enzymatisch wirksamen Komplex, der die Umwandlung des Faktors IX in die aktive Form katalysiert. Aktivierter-Faktor IX bildet mit Faktor VIII, Kalziumionen und Phospholipid den Faktor X-Aktivator.

TFPI-1 hemmt den exogenen Weg der Blutgerinnung durch Bildung eines quaternären Komplexes mit Faktor Xa und TF/Faktor VIIa. Es werden zwei Wege der Faktor Xa-abhängige Hemmung von Faktor VII/TF durch TFPI-1 diskutiert: 1) Löslicher Faktor Xa wird von Faktor VIIa/TF freigesetzt und von TFPI-1 gebunden. Faktor Xa-TFPI-1 bindet Faktor VIIa/TF und bildet einen quartären Komplex FXa-TFPI-1-FVIIa/TF. 2) TFPI-1 bindet an einen tertiären Komplex aus Faktor Xa-Faktor VII/TF. Aufgrund kinetischer Untersuchungen wird vermutet, dass der zweite Weg eher zutrifft (Baugh *et al.*, 1998; Broze, 2003). Im reaktiven Zentrum der *Kunitz*-Typ-Domäne 1 wird eine Lysin-Alanin Bindung bei der Inhibierung des TF-FVIIa-Komplexes durch FVIIa gespalten. In der *Kunitz*-Typ-Domäne 2 wird Arginin-Glycin durch FXa bei dessen Inhibierung gespalten.

Die Verteilung von TFPI-1 im Blutstrom ist unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sehr heterogen (Abb. 2-3).

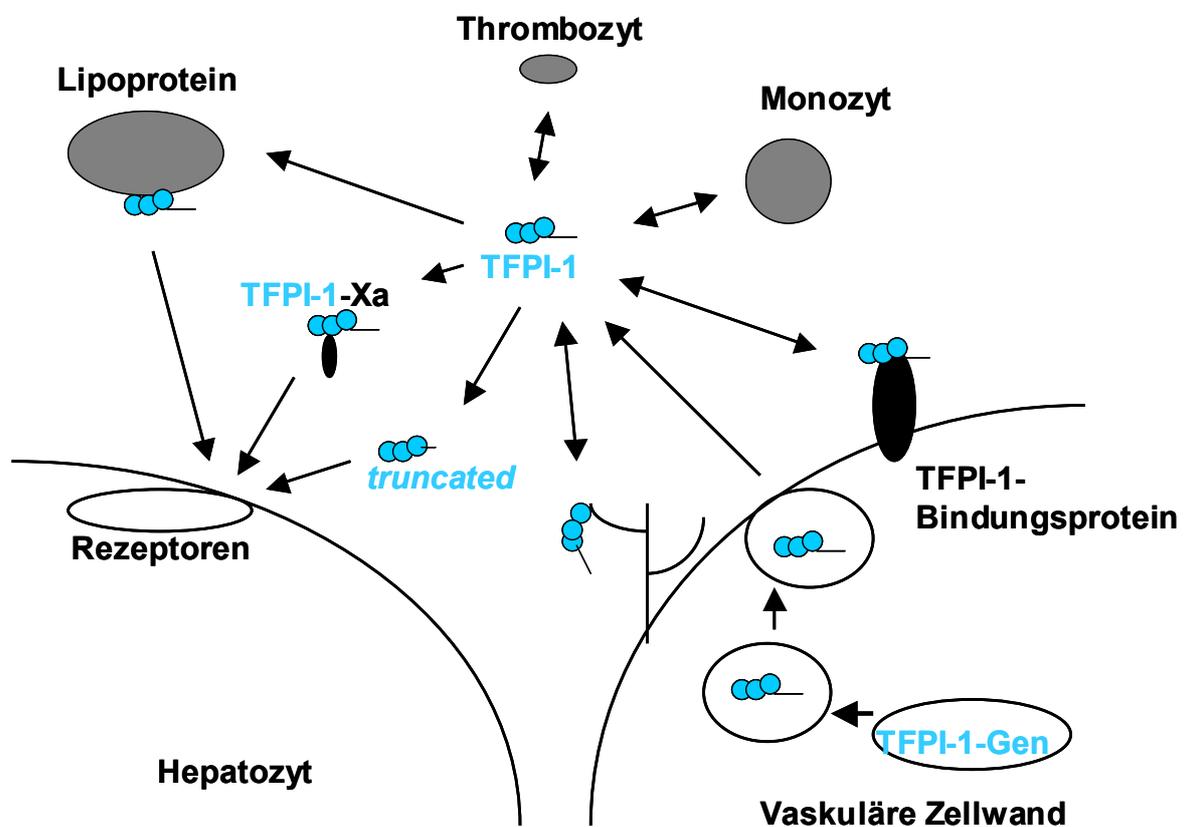


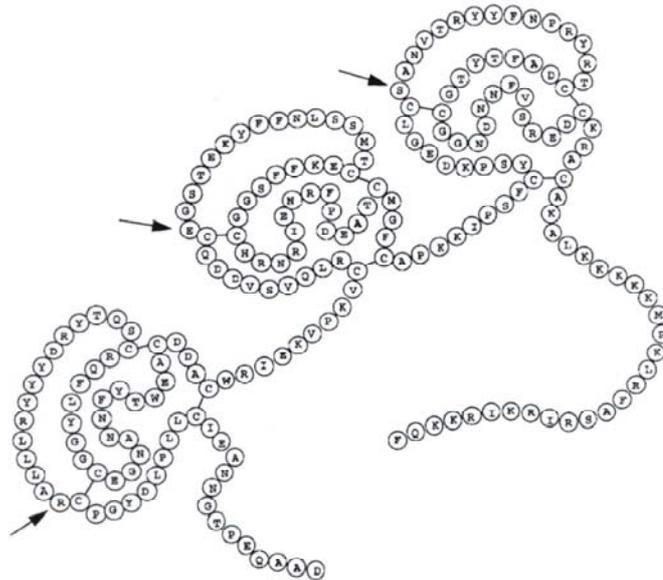
Abb. 2-3: Heterogene Verteilung der TFPI-1 Formen im Blutstrom (Kato, 2002).

TFPI-1 existiert in einer freien und in einer Lipoprotein-gebundenen Form (Broze *et al.*, 1994). Endothelzellen, Thrombozyten und Monozyten sezernieren TFPI-1 in den Blutstrom. TFPI-1 im Komplex mit Faktor Xa und/oder Faktor VIIa tritt unter pathologischen Bedingungen auf. Diese TFPI-1-Formen werden von Hepatozyten der Leber metabolisiert, aber auch andere vaskuläre Zellwandzellen können TFPI-1 aufnehmen. TFPI-1 verursacht eine permanente Herunterregulierung von an der Zelloberfläche gebundenem TF in Monozyten und Fibroblasten über Aufnahme und Abbau durch LDL-Rezeptor verwandte Proteine (Hamik *et al.*, 1999; Iakhiaev *et al.*, 1999). Hauptsächlich kommt TFPI-1 als Endothelzell-assoziierte Form vor. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass TFPI-1 über Heperansulfatproteoglykane (Syndecan, Glypican) an Endothelialzellen binden (Mast *et al.*, 1997). Möglicherweise sind weitere Proteine auf der Zelloberfläche an der Bindung von TFPI-1 an Zellen beteiligt. TFPI-1 bindet an Thrombospondin-1 von Thrombozyten (Mast *et al.*, 2000).

In zahlreiche Studien wurde die TFPI-1-Konzentration und die TFPI-1-Aktivität im Plasma bei verschiedenen Erkrankungen untersucht. Erhöhte TFPI-1-Konzentrationen im Plasma wurden zum Beispiel bei Hypercholesterinämie, inflammatorischen Erkrankungen, insulinabhängigem Diabetes mellitus und nach akutem myokardialen Infarkt gemessen (Busso *et al.*, 2003; Leurs *et al.*, 2003; Brodin *et al.*, 2004). Bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen konnten stark erhöhte TFPI-1-Aktivitäten nachgewiesen werden (Iversen *et al.*, 2002). Diese stammen wahrscheinlich aus der erhöhten Syntheserate der Epithelzellen, möglicherweise bedingt durch die Gabe von Zytokinen. Des weiteren wurden arterielle und venöse Thrombosen sowie koronare Herzerkrankungen untersucht, bei denen ein TF-verursachte Gerinnung eine Rolle spielt (Dahm *et al.*, 2003, Golino *et al.* 2003, Duering *et al.*, 2004).

### **2.3. Tissue factor pathway inhibitor-2**

*Tissue factor pathway inhibitor-2*, ursprünglich auch *Placenta protein 5* genannt, besitzt eine ähnliche Struktur wie TFPI-1 (Siiteri *et al.*, 1982; Bützow *et al.*, 1988; Kisiel *et al.*, 1994). Die Klonierung und Charakterisierung von TFPI-2 zeigt eine homologe primäre Aminosäuresequenz und eine ähnliche *Kunitz-Typ*-Domänen Struktur (Abb. 2-4) (Sprecher *et al.*, 1994; Miyagi *et al.*, 1994). Auf ein Signalpeptid aus 22 Aminosäuren folgt das reife Proteine mit 213 Aminosäuren, mit 18 Cysteinen und 2 N-glykosidischen Bindungsstellen (Asn 116 und Asn 170 der zweiten und dritten *Kunitz-Typ*-Domäne) (Sprecher *et al.*, 1994). Das Molekulargewicht liegt zwischen 27 und 32 kDa, je nach Glykolysegrad.



**Abb. 2-4:** Postulierte sekundäre Struktur des TFPI-2 (Sprecher *et al.*, 1994).

TFPI-2 ist eine Glykoprotein, das mit Molekülen der extrazellulären Matrix assoziiert ist. Verschiedene Zelltypen einschließlich Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Syncytiotrophoblasten und Cytotrophoblasten synthetisieren TFPI-2 (Rao *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1995; Udagawa *et al.*, 1998; Bützow *et al.*, 1988, Hube *et al.*, 2003). TFPI-2 hemmt eine große Anzahl von Serinproteinasen unter anderem Plasmin, Chymotrypsin, Plasma Kallikrein und FXIa. Faktor VII, TF, Polylysin und Kathepsin G werden nur schwach gehemmt (Peterson *et al.*, 1996). Die TFPI-2-Konzentration in Humanplasma beträgt 0,43-0,49 ng/ml (Bützwo *et al.*, 1988). TFPI-2 wird in Endothelzellen verschiedener Blutgefäße (Venen, Arterien, Kapillaren) synthetisiert und wird hauptsächlich (60-90%) in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Iino M, *et al.*, 1998).

### 2.3.1. Das TFPI-2-Gen und seine Promotorregion

Das humane TFPI-2-Gen umfasst ~7 kb und ist auf Chromosom 7q22 lokalisiert (Miyagi *et al.*, 1996). Es ist aus 5 Exons und 4 Introns aufgebaut und jede der drei *Kunitz*-Typ-Domänen wird von einem Exon kodiert. Die Nukleotid-Sequenzen um die Exon-Intron Bindungen sind hochkonserviert und folgen der GT-AG Regel.

Im Gegensatz zu TFPI-1, besitzt das TFPI-2-Gen keine weiteren Exons in der 5'-flankierenden Region, noch Exons, die eine Verbindungsdomäne zwischen jeder *Kunitz*-Typ-Domäne kodieren. Die *Kunitz*-Typ-Domäne 3 von TFPI-2 ist hoch konserviert mit 53%, Domäne 1 mit 43% und Domäne 2 mit 35% Sequenzhomologie zu TFPI-1 (Sprecher *et al.*, 1994).

Domäne 2 besitzt zwei zusätzliche Aminosäuren zwischen dem 4. und 5. Cysteinrest und vergrößert so die Schlaufe. Der wahrscheinliche P1 reaktive Rest der 1. *Kunitz*-Typ-Domäne ist für TFPI-2 ein Arginin und für TFPI-1 ein Lysin. In der 2. *Kunitz*-Typ-Domäne ist P1 für TFPI-2 Glutaminsäure und Arginin für TFPI-1. Der P1 reaktive Rest der 3. *Kunitz*-Typ-Domäne ist Serin (Sprecher *et al.*, 1994).

Die TFPI-2-Promotorregion ist sehr GC-reich und besitzt, wie TFPI-1, keine TATA- und keine CAAT-Box (Kamei *et al.*, 2001; Hube *et al.*, 2003). Drei Transkriptionsinitiationsstellen, eine major (-75) und zwei minor (-49 und -38) sind in der Promotorregion lokalisiert. Der minimale Promotor ist zwischen -166 und -111 vom Translationsstart entfernt lokalisiert, dies konnte mit Hilfe von unterschiedlichen TFPI-2/Luziferase Reportergeräten-Konstrukten gezeigt werden (Hube *et al.*, 2003). Die Luziferase-Aktivität steigt nach Stimulation von JEG-3 Zellen mit Phorbol12-myristate13-acetat an, dies lässt die Vermutung zu, dass NF1, NF $\kappa$ B und erg-1/Sp1 Bindungsstellen entscheidend sind bei der TFPI-2-Expression (Hube *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert wie zum Beispiel: MyoD, LYF1, NF-Y, GATA, Oct-1, AP-1, Sp-1, NF1, NF $\kappa$ B und erg-1 (Hube *et al.*, 2003).

### 2.3.2. Polymorphismen im TFPI-2-Genom

Bisher sind keine krankheitsassoziierten Polymorphismen des TFPI-2-Gens und seiner Promotorregion identifiziert worden.

### 2.3.3. Physiologie und Pathobiochemie von TFPI-2

Die physiologische Bedeutung von TFPI-2 ist weiterhin unklar. Die TFPI-2-Konzentration im Plasma ist während der Schwangerschaft erhöht und beeinflusst möglicherweise die Hämostase während der Schwangerschaft (Seppälä *et al.*, 1983).

In zahlreichen Studien wurde eine Beteiligung von TFPI-2 an Arteriosklerose, inflammatorischen Prozessen und Tumorinvasion untersucht.

TFPI-2 wird in nicht-invasiven Gliomazellen stark exprimiert, während es in invasiven Zellen schwach exprimiert wird (Rao *et al.*, 2001; Konduri *et al.*, 2001; Konduri *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt TFPI-2 eine Rolle bei der Tumorinvasion verschiedener Zelltypen (Lakka *et al.*, 2000; Konduri *et al.*, 2001). TFPI-2 verringert die Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-3, MMP-9 und MMP-13, indem es Plasmin und Trypsin inhibiert und dadurch die Tumorinvasion und die Metastasenbildung reduziert (Rao *et al.*, 1999).

Die Identifizierung einer CpG-Insel (~220 bp), die Exon 1 und die drei Transkriptionsstartstellen umspannt, lässt die Vermutung zu, dass der TFPI-2-Gen-Promotor über DNA Methylierung reguliert wird. Eine Hypermethylierung des TFPI-2-Gens korreliert mit „*transcriptional silencing*“ so dass, das TFPI-2-Gen möglicherweise ein Tumorsuppressorgen ist (Hube, *et al.*, 2003).

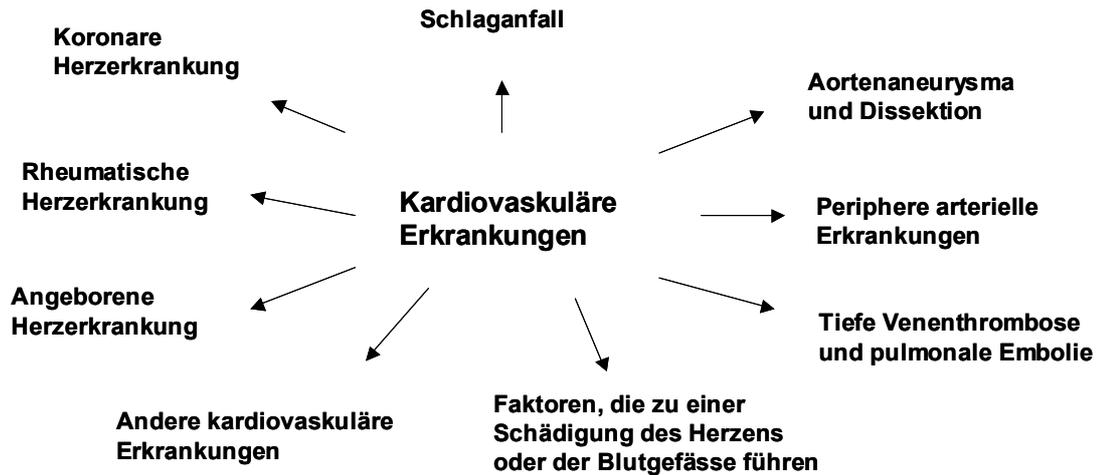
Des Weiteren konnte die TFPI-2-Expression in Makrophagen, T-Zellen und glatten Muskelzellen der Aorta nachgewiesen werden (Crawley *et al.*, 2002; Blindt *et al.*, 2002). TFPI-2 reguliert Plasmin in atherosklerotischen Plaques und verändert so extrazelluläre und proteolytische Mechanismen. Inflammatorische Agenzien inklusive Phorbolester, Endotoxine und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  steigern die Synthese und Sekretion von TFPI-2 in HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*)-Zellen (Iino *et al.*, 1998).

TFPI-2 fungiert als Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen und korreliert mit diesen invers in humanen Arterien. Ein lokaler TFPI-2-Mangel fördert möglicherweise die Artherosklerotische Plaquebildung (Herman *et al.*, 2001). Eine weitere Studie zeigt spezifische Interaktionen zwischen dem Komplement, Kininogen Bindungsprotein gC1qR/p33 (gC1qR) und TFPI-2 (Peerschke *et al.*, 2004). gC1qR wird von verschiedenen Zellen synthetisiert und ist möglicherweise an Gewebsumbau und Entzündungsprozessen beteiligt, indem es TFPI-2 in der perizellulären Umgebung erkennt und die lokale Proteaseaktivität verändert und hochmolekulares Kininogen reguliert. Diese Interaktionen können Gewebsentzündungen, Wundheilung, Angiogenese und Thrombose beeinflussen.

Artherosklerose wird oft als „Arterienverkalkung“ bezeichnet, durch Einlagerung von Cholesterin, Blutzellen, Bindegewebe und Kalksalzen wird die normale elastische Gefäßwand zunehmend starr. Die glatte Innenwand wird rau, die Ablagerungen (Artherosklerotische Plaques) wachsen an, so dass sie Gefäße immer mehr verengen. Das Abreißen dieser Plaques kann sekundär zu Myokardinfarkt, Schlaganfall oder zu peripherem arteriellen Verschluss führen.

#### **2.4. Das Herz-Kreislaufsystem und seine Erkrankungen**

Das Kreislaufsystem ist das Transportsystem des Körpers, das Sauerstoff, Nährstoffe und Botenstoffe wie z.B. Hormone, mit dem Blut in jede Zelle des Körpers transportiert. Das Herz arbeitet wie eine Doppelpumpe und pumpt täglich zwischen 6.000-8.000 Liter Blut. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind vielfältig und in Abbildung 2-5 zusammengefasst.



**Abb. 2-5:** Kardiovaskuläre Erkrankungen.

Hierzu zählen: 1) Schlaganfall, 2) koronare Herzerkrankungen, 3) Rheumatische Herzerkrankungen, 4) angeborene Herzerkrankungen, 5) andere kardiovaskuläre Erkrankungen wie z.B. Tumore, 6) andere Faktoren die das Herz oder Blutgefäßsystem schädigen, 7) periphere arterielle Erkrankungen, 8) tiefe venöse Thrombose und pulmonale Embolien, 9) Aortenaneurysma und Dissektion (<http://www.who.int.>).

Weltweit sterben jährlich ~16,7 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, davon sterben ~7,2 Millionen Menschen an koronarer Herzerkrankung und ~5,5 Millionen an Schlaganfall (<http://www.who.int.>). In Deutschland erleiden jährlich ~200 000 Menschen einen Schlaganfall, jeder 5. verstirbt an den direkten Folgen.

### 2.4.1. Schlaganfall und seine Entstehung

Unter Schlaganfall, oder Hirnschlag (Apoplex) versteht man einen unvermittelten Ausfall bestimmter Funktionen des Gehirns, infolge einer Durchblutungsstörung des Gehirns oder einer Hirnblutung. In 70-80% der Fälle entsteht ein Schlaganfall durch eine Durchblutungsstörung oder Mangel durchblutung des Gehirns. Ursache hierfür kann ein Blutgerinnsel (Thrombus) sein, das sich im Herzen oder in den zum Gehirn führenden Gefäßen gebildet hat und nach Ablösung eine Hirnarterie verstopft (Thromboembolie). Der Verschluss einer Hirnarterie kann durch Arteriosklerose an den Hirngefäßen oder hirnversorgenden Gefäßen ausgelöst werden. Hirnblutungen (10-15%) entstehen durch Austritt von Blut aus unter hohem Druck geplatzten, meist durch Arterienverkalkung vorgeschädigten Gefäßen, in das umliegende Gewebe.

Eine weitere Ursache (2-5% der Fälle) sind Subarachnoidalblutungen in den Raum zwischen Gehirn und weicher Hirnhaut. Kommt es im Hirn zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff (Ischämie) und Nährstoffen, sterben Nervenzellen ab, die auf die Blutzufuhr der betroffenen Gefäße angewiesen sind. Die geschädigten Nervenzellen können ihre Funktion nicht mehr erfüllen, so dass es zu Ausfällen der Hirnleistung, oder zum Tod kommen kann.

Das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden kann in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren unterteilt werden. Zu den beeinflussbaren Faktoren zählen u.a. Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung, Diabetes mellitus, Vorhofflimmern, Rauchen, Alkohol, Fehlernährung bei Übergewicht und Bewegungsmangel. Nicht beeinflussbare Faktoren sind das Lebensalter und die genetische Disposition.

Generell steigt das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden mit zunehmenden Lebensalter an, aber auch jüngere Menschen (15% < 45 Jahre) erleiden einen Schlaganfall.

Die Risikofaktoren für Gefäßerkrankungen (Schlaganfall, Herzinfarkt, arterielle Verschlusskrankheit) beeinflussen sich gegenseitig und dieses negative Zusammenspiel äußert sich in einem erhöhten Gesamtrisiko.

## 2.5. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die *Kunitz*-Typ-Inhibitoren TFPI-1, -2 und die [P151L]TFPI-1-Mutante kloniert und in einem Insektenzell- und einen Säugerzell-Expressionssystem rekombinant dargestellt werden. Die Konzentration und inhibitorische Aktivität der rekombinant exprimierten Proteine sollte quantitativ ermittelt werden.

Im zweiten Teil sollten die TFPI-Gene auf krankheitsassoziierte Polymorphismen untersucht werden. Die denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatografie (DHPLC), eine neue Methode für die Identifizierung genetischer Variationen, sollte für die kodierenden Bereiche des TFPI-1- und des TFPI-2-Gens und die Promotorregion von TFPI-2 etabliert werden. Es sollten Patienten nach ischämischen Schlaganfall und Patienten nach einer *Stent*-Implantation untersucht werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten die identifizierten Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A in der Promotorregion des TFPI-2-Gens auf ihren Einfluss auf die Promotoraktivität untersucht werden. Hierfür sollte das WT-TFPI-2-Promotorfragment amplifiziert und in den Vektor pSEAP2-*Basic* kloniert werden. Der Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle und ein SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-Reportergen, aber keinen eukaryotischen Promotor und keine *Enhancer* und stellt somit ein geeignetes Reportersystem für die Untersuchung der Promotoraktivität dar. Die sieben verschiedenen Promotormutanten sollten mit Hilfe der *site-directed* Mutagenese hergestellt werden. HEK-293-Zellen sollten mit dem Plasmid pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-PF und mit Plasmiden, die einen Nukleotidaustausch in der cDNA des WT-TFPI-2-PF enthalten, transfiziert werden. Die Promotoraktivität sollte mit einem Test ermittelt werden, der die SEAP-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt.

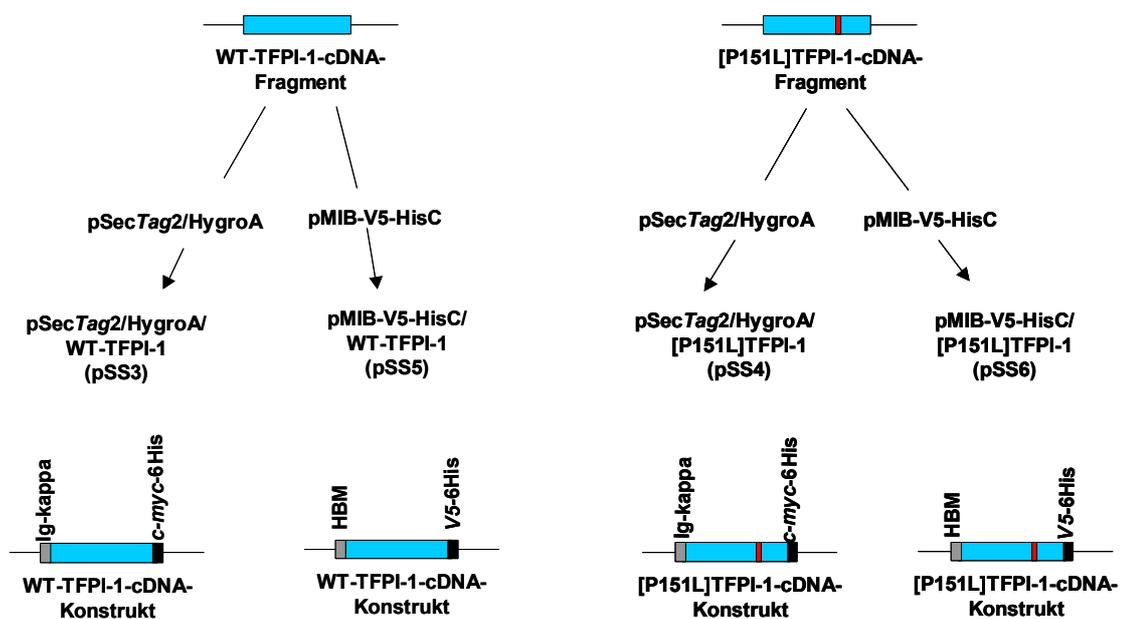
## 3 Ergebnisse

### 3.1. Klonierung und Expression des WT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante

Für die Untersuchung des TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante wurden diese kloniert und in einem Säugerzell- und einem Insektenzellensystem rekombinant dargestellt.

#### Strategie zur Klonierung des WT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante

1. Synthese der WT-TFPI-1-cDNA aus der humanen Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 und Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor.
2. Mutagenese der WT-TFPI-1-cDNA: Einführung der Punktmutation 536C>T [P151L]
3. Amplifizierung der WT-TFPI-1-cDNA und der [P151L]TFPI-1-cDNA ohne Start- und ohne Stopkodon und Klonierung in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1:** Strategie für die Klonierung der WT-TFPI-1-cDNA und der [P151L]TFPI-1-cDNA in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC. Der Polymorphismus 536C>T der [P151L]TFPI-1-cDNA ist rot markiert. Dargestellt sind die cDNA-Konstrukte mit Sequenzen für das Sekretionssignal und das Tag.

Ig-Kappa: Sequenz des Ig-kappa-Kettenleitsignals, *c-myc*-6His: Sequenz für das *c-myc*-Epitop und das 6-Histidin-Tag

HBM (*Honeybee melittin secretion signal*): Sequenz für das Sekretionssignal des Honigbienen-Mellitin, V5-6His: Sequenz für das V5-Epitop und das 6-Histidin-Tag

### 3.1.1. Synthese und Klonierung der humanen TFPI-1-cDNA

Aus der humanen Chondrosarkom-Zelllinie SW1353 wurde Gesamt-RNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde die cDNA hergestellt und in eine PCR-Reaktion für die Amplifizierung der gesamten WT-TFPI-1-cDNA mit den Primern ges.TFPI<sub>up</sub> und ges.TFPI<sub>low</sub> eingesetzt (Abb. 3-2).

```

1  CAAGAACTTT CATCAGAGAT TTTACTTTAG ATGATTTACA CAATGAAGAA
51  AGTACATGCA CTTTGGGCTT CTGTATGCCT GCTGCTTAAT CTTGCCCCCTG
101 CCCCTCTTAA TGCTGATTCT GAGGAAGATG AAGAACACAC AATTATCACA
151 GATACGGAGT TGCCACCACT GAAACTTATG CATTCAATTT GTGCATTCAA
201 GGGCGATGAT GGCCCATGTA AAGCAATCAT GAAAAGATTT TTCTTCAATA
251 TTTTCACTCG ACAGTGGCAA GAATTTATAT ATGGGGGATG TGAAGGAAAT
301 CAGAATCGAT TTGAAAGTCT GGAAGAGTGC AAAAAAATGT GTACAAGAGA
351 TAATGCAAA CAGGATTATAA AGACAACATT GCAACAAGAA AAGCCAGATT
401 TCTGCTTTTT GGAAGAAGAT CCTGGAATAT GTCGAGGTTA TATTACCAGG
451 TATTTTATA ACAATCAGAC AAAACAGTGT GAACGTTTCA AGTATGGTGG
501 ATGCCTGGGC AATATGAACA ATTTTGAGAC ACTGGAAGAA TGCAAGAACA
551 TTTGTGAAGA TGGTCCGAAT GGTTCAGG TGGATAATTA TGGAACCCAG
601 CTCAATGCTG TGAATAACTC CCTGACTCCG CAATCAACCA AGGTTCCCAG
651 CCTTTTGAA TTTTACGGTC CCTCATGGTG TCTCACTCCA GCAGACAGAG
701 GATTGTGTCG TGCCAATGAG AACAGATTCT ACTACAATTC AGTCATTGGG
751 AAATGCCGCC CATTTAAGTA CAGTGGATGT GGGGGAAATG AAAACAATTT
801 TACTTCCAAA CAAGAATGTC TGAGGGCATG TAAAAAAGGT TTCATCCAAA
851 GAATATCAAA AGGAGGCCCTA ATTAAAACCA AAAGAAAAAG AAAGAAGCAG
901 AGAGTAAAA TAGCATATGA AGAAATTTTT GTTAAAAATA TGTGAATTTG
951 TTATAGCAA

```

**Abb. 3-2:** Nukleotidsequenz der WT-TFPI-1-cDNA. Start- und Stopkodon sind fett gedruckt und die homologen Primersequenzen unterstrichen.

Das amplifizierte Produkt (959 bp) wurde in den pCR 2.1-TOPO-Vektor kloniert und es wurden *E.coli TOP 10*-Zellen transformiert. Die erhaltenen Klone wurden auf die Insertion der WT-TFPI-1-cDNA untersucht. Hierfür wurde Plasmid-DNA isoliert und nach einer Restriktionsspaltung mit *EcoRI* im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Plasmide mit inserierter TFPI-1-cDNA wurden in ein Fragment von 3890 bp Länge (Vektor) und ein Fragment von 976 bp Länge (*Insert*) gespalten. Die inserierte WT-TFPI-1-cDNA des Klons pSS1 wurde doppelsträngig sequenziert und mit der bereits veröffentlichten TFPI-kodierenden Sequenz humaner Plazenta-DNA verglichen (Wun *et al.*, 1988). Die ermittelte Sequenz zeigte eine 100%ige Homologie zur veröffentlichten Sequenz.

### 3.1.2. Mutagenese der humanen WT-TFPI-1-cDNA

Die von unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebene Punktmutation 536C>T (Kleesiek *et al.*, 1998) in Exon VII des TFPI-1-Gens wurde mittels *site-directed* Mutagenese in die WT-TFPI-1-cDNA eingeführt.

Der Vektor pCR2.1-TOPO/WT-TFPI-1 (pSS1) wurde in einer PCR-Reaktion unter Verwendung des Mutagenese-Primerpaars MutP151L<sub>up</sub> und MutP151L<sub>low</sub> amplifiziert. Es wurden *E.coli* XL10-Gold-Zellen mit den so synthetisierten Plasmiden transformiert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung bestätigt und das Plasmid pCR2.1TOPO/[P151L]TFPI-1 wurde pSS2 genannt.

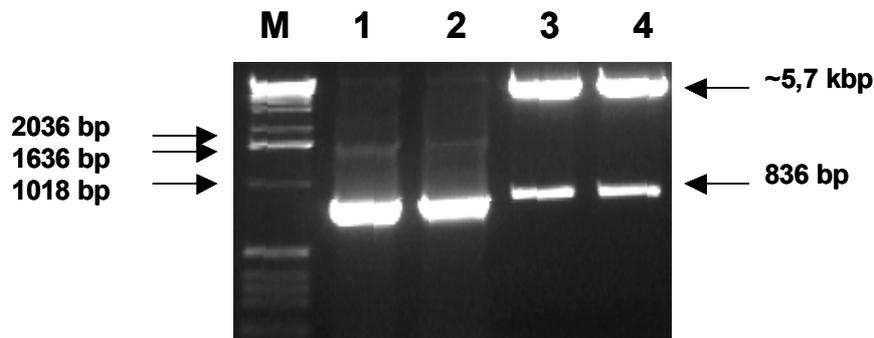
### 3.1.3. Klonierung des WT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante

#### 3.1.3.1. Klonierung in den Expressionsvektor pSecTag2/HygroA

Zur Expression und Sekretion rekombinanter Proteine in Säugerzellen sind die Vektoren pSecTag2/HygroA, B und C gut geeignet. Die Vektoren haben jeweils eine Größe von 5,7 kbp und enthalten ein Hygromycin-B-Resistenzgen für die Selektion von Säugerzellen und ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion von Bakterienzellen. Die TFPI-1-cDNA wurde im richtigen Leserahmen ohne Start- und Stopkodon in den Expressionsvektor pSecTag2/HygroA kloniert. Auf die Sequenz des Ig-Kappa-Kettenleitsignals folgt die inserierte TFPI-1-cDNA und die Sequenz für das *c-myc*-Epitop und das 6-Histidin-Tag für die Detektion und Aufreinigung.

Zunächst wurde die isolierte cDNA für WT-TFPI-1 und [P151L]TFPI-1-Mutante in eine PCR-Reaktion mit den Primern MamTFPIHindIII und MamTFPIXhoI, die Schnittstellen für *HindIII* bzw. *XhoI* enthalten, eingesetzt. Die so hergestellten Amplifikate (846 bp) und die Plasmid-DNA des Vektors pSecTag2/HygroA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* gespalten. Die Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Plasmid-DNA des linearisierten Vektors pSecTag2/HygroA und die geschnittene *Insert*-DNA aus dem Gel eluiert. Die eluierten DNA-Fragmente wurden über Nacht mit einer T4-Ligase ligiert und es wurden *E.coli* TOP 10-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Aufnahme der *Insert*-DNA in den Expressionsvektor pSecTag2/HygroA wurde mit einer PCR-Reaktion und einer Restriktionsspaltung überprüft. Hierfür wurde Plasmid-DNA aus den erhaltenen Klonen isoliert und mit den Primern MamTFPIHindIII und MamTFPIXhoI amplifiziert. Klone, die das Amplifikat aufgenommen haben, enthalten ein *Insert* von 846 bp. Des Weiteren wurde eine Restriktionsspaltung mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XhoI* durchgeführt. Plasmide mit inseriertem TFPI-1-cDNA- bzw. [P151L]TFPI-1-cDNA-Konstrukt wurden in ein Fragment von ~5,7 kbp (Vektor) und ein Fragment von ~836 bp (*Insert*) gespalten (Abb. 3-3).

Die korrekte Insertion der WT-TFPI-1-cDNA (pSS3) und der [P151L]TFPI-1-cDNA (pSS4) in den Expressionsvektor pSecTag2/HygroA wurde mittels Sequenzierung bestätigt.



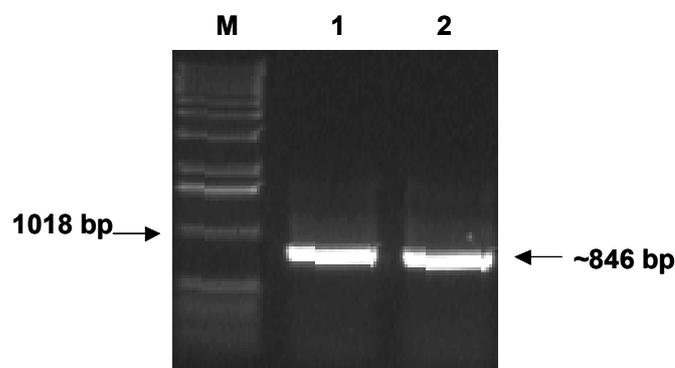
**Abb. 3-3:** Agarosegel-Elektrophorese zur Überprüfung der Klone pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-1 (pSS3) und pSecTag2/HygroA/[P151L]TFPI-1 (pSS4). Spur M: 1 kb DNA-Längenstandard, Spur 1: PCR-Produkt (846 bp) mit den Primern MamTFPIHindIII und MamTFPIXhol von der Plamid-DNA des Klons pSS3, Spur 2: PCR-Produkt (846 bp) mit den Primern MamTFPIHindIII und MamTFPIXhol von der Plamid-DNA des Klons pSS4, Spur 3: Restriktionsspaltung des Plasmids pSS3 mit *HindIII* und *XhoI* und Spur 4: Restriktionsspaltung des Plasmids pSS4 mit *HindIII* und *XhoI*. Der Vektor besitzt eine Größe von 5,7 kbp und das klonierte *Insert*-cDNA-Fragment 836 bp.

### 3.1.3.2. Klonierung in den Expressionsvektor pMIB-V5-HisC

Die Vektoren pMIB-V5-HisA, B und C haben jeweils eine Größe von 3,6 kbp und besitzen einen *OpIE2*-Promotor für eine starke Expression eines inserierten Gens. Das Melittin-Sekretionssignal der Honigbiene (HBM) dient zur Sekretion des exprimierten Proteins und der *OpIE1*-Promotor zur Expression des Blasticidin-Resistenzgens, welches die Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie erlaubt. Des weiteren besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion von transformierten *E.coli*-Klonen. Das V5-Epitop und das His<sub>6</sub>-Tag eignen sich für die Detektion des rekombinanten Fusionsproteins und die Aufreinigung. Die TFPI-1-cDNA wurde ohne Signalsequenz und ohne Stopkodon im richtigen Leserahmen in den Vektor pMIB-V5-HisC kloniert. Auf die Sequenz des Melittin-Sekretionssignals der Honigbiene folgt die inserierte cDNA und die Sequenz für das V5-Epitop und das 6-His-Tag. Die Klonierung in den Insektenzellvektor pMIB-V5-HisC erfolgte analog zur Klonierung in den Säugerzellvektor. Hierfür wurde die isolierte WT-TFPI-1-cDNA und die [P151L]TFPI-1-cDNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt und mit den Primern InsTFPIHindIII und InsTFPIXhol, die Schnittstellen für *HindIII* bzw. *XhoI* enthalten, amplifiziert.

Die so hergestellten Amplifikate und die Plasmid-DNA des Vektor pMIB-V5-HisC wurden mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* gespalten.

Die Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Plasmid-DNA des linearisierten Vektors und die restringierte *Insert*-DNA wurden aus dem Gel eluiert. Die eluierten DNA-Fragmente wurden in eine Ligation eingesetzt und es wurden *E.coli TOP 10*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Aufnahme des *Inserts* in den Expressionsvektor pMIB-V5-HisC wurde mit einer PCR-Reaktion überprüft. Hierfür wurde Plasmid-DNA aus den erhaltenen Klonen isoliert und mit *den* Primern InsTFPIHindIII und InsTFPIXhol amplifiziert. Plasmide mit TFPI-1-cDNA- bzw. [P151L]TFPI-1-cDNA-Konstrukt amplifizieren ein PCR-Produkt von ~846 bp (Abb. 3-4). Die korrekte Insertion der WT-TFPI-1-cDNA (pSS5) und der [P151L]TFPI-1-cDNA (pSS6) in den Expressionsvektor pMIB-V5-HisC wurde nach Doppelstrangsequenzierung bestätigt.

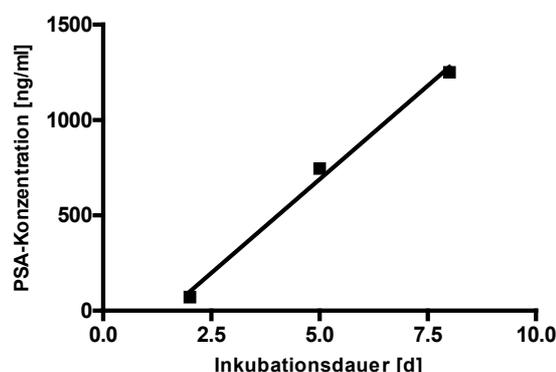


**Abb. 3-4:** Agarosegel-Elektrophorese zur Überprüfung der Kone pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-1 (pSS5) und pMIB-V5-HisC/[P151L]TFPI-1 (pSS6). Spur M: 1 kb DNA-Längenstandard, Spur 1: PCR-Produkt (846bp) mit den Primern InsTFPIHindIII und InsTFPIXhol von der Plasmid-DNA des Klones pSS5, Spur 2: PCR-Produkt (846 bp) mit den Primern InsTFPIHindIII und InsTFPIXhol von der Plasmid-DNA des Klones pSS6.

### 3.1.4. Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante in Säugerzellen

COS-1-Säugerzellen wurden transient mit den zuvor beschriebenen Vektoren pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-1 (pSS3) und pSecTag2/HygroA/[P151L]TFPI-1 (pSS4) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pSecTag2/HygroA, und als Positivkontrolle der Vektor pSecTag2/HygroA/PSA, transfiziert. Eine Transfektionseffizienz von ~15-20% wurde mit Hilfe des parallel transfizierten Vektors pcDNAHisMaxLacZ und anschließender X-Gal-Färbung ermittelt. Die Zellkulturüberstand wurde jeweils nach 1, 2, 5 und 8 Tagen entnommen und die Genexpression kontrolliert. Die sekretorisch exprimierten Proteine besitzen ein Ig-Kappa-Leitsignal und C-terminal ein *c-myc*-Epitop und ein His<sub>6</sub>-Tag.

Der Vektor pSecTag2/Hygro/PSA dient als Positivkontrolle für eine erfolgreiche PSA-Expression und Sekretion in den Zellkulturüberstand. Die PSA-Konzentration von nicht aufkonzentriertem Zellkulturüberstand stieg innerhalb von 2 bis 8 Tagen nach der Transfektion von 72 auf 1250 ng/ml an (Abb. 3-5). Für die Negativkontrolle wurden Werte <0,04 ng/ml ermittelt.



**Abb. 3-5:** Bestimmung der PSA-Konzentration im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen, die mit dem Vektor pSecTag2/Hygro/PSA transfiziert wurden, nach 2, 5 und 8 Tagen.

### 3.1.4.1. Nachweis im *Dot-Blot-ELISA*

Im *Dot-Blot-ELISA* wurden COS-1-Zellkulturüberstände auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Als Primärantikörper wurde Kaninchen Anti-human TFPI IgG (1:500) und als Sekundärantikörper ein Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:1000) eingesetzt. Für Zellkulturüberstände von nicht-transfizierten COS-1-Zellen und von Zellen, die mit der Plasmid-DNA des Vektors pSecTag2/Hygro/PSA transfiziert wurden, waren keine Signale nachweisbar. Im Ansatz konnte für rWT-TFPI-1 und die [P151L]TFPI-1-Mutante jeweils ein schwaches Signal detektiert werden (Tab. 3-1).

PSA			rWT-TFPI-1			[P151L]TFPI-1		
2 Tage	5Tage	8 Tage	2 Tage	5Tage	8 Tage	2 Tage	5 Tage	8 Tage
-	-	-	+	(+)	+	+	+	+

**Tab. 3-1:** *Dot-Blot-ELISA*: Semiquantitativer Nachweis des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante im Zellkulturüberstand nach 2, 5 und 8 Tagen nach erfolgter Transfektion. Die Farbintensität nach erfolgter Farbreaktion wurde von - (nicht sichtbar) bis +++ (intensive Farbbildung) beurteilt.

### 3.1.4.2. Quantitativer Gesamt-TFPI-1 Nachweis

Mit dem *IMUBIND Total TFPI ELISA* wurde die Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen nach 2, 5, und 8 Tagen Inkubation ermittelt. Für die Kontrollen, Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen, die mit den Plasmiden pSecTag2/Hygro/PSA und pcDNAHisMaxLacZ transfiziert wurden, konnte kein TFPI-Expression nachgewiesen werden. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass rekombinantes WT-TFPI-1 bzw. die Mutante bereits nach 24 h nachweisbar war, die Expressionsrate dann aber nicht weiter anstieg. Die maximale Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48 h betrug für rWT-TFPI-1 437 ng/ml und für die r[P151L]TFPI-1-Mutante 426 ng/ml.

### 3.1.4.3. Quantitative Bestimmung der TFPI-1-Aktivität

Die TFPI-Aktivität wurde in Zellkulturüberständen von COS-1-Zellen gemessen. Die Werte für die Aktivität des rWT-TFPI-1 lagen bei 0,015 U/ng und für die r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 0,016 U/ng. Die relative Aktivität des rWT-TFPI-1 lag bei 83% der Aktivität von nativem TFPI und für die r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 89%.

### 3.1.5. Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante in Insektenzellen

*High Five*-Insektenzellen wurden mit den zuvor beschriebenen Vektoren pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-1 (pSS5) und pMIB-V5-HisC/[P151L]TFPI-1 (pSS6), transient mit *Cellfectin*, transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pMIB-V5-HisC transfiziert. Die Kultivierung, der sowohl adhärent, als auch in Suspensionskultur-wachsenden Zellen, wurde in serumfreiem Medium durchgeführt und erleichtert so die Aufreinigung von sekretorisch exprimiertem Protein.

Der Zellkulturüberstand wurde jeweils nach 24, 48, und 96 h entnommen und die Genexpression kontrolliert. Die sekretorisch exprimierten Proteine besitzen ein Melittin-Sekretionssignal und C-terminal ein V5-Epitop und ein His<sub>6</sub>-Tag.

#### 3.1.5.1. Nachweis im *Dot-Blot-ELISA*

Im *Dot-Blot-ELISA* wurde rWT-TFPI-1 und r[P151L]TFPI-1-Mutante semiquantitativ nachgewiesen. Hierfür wurde der geerntete Zellkulturüberstand ~20-fach aufkonzentriert. Es wurden zwei verschiedene ELISA durchgeführt. Im ersten ELISA wurde der auf einer PVDF-Membran immobilisierte TFPI-1-haltige Zellkulturüberstand mit einem Anti-V5-HRP-gekoppelten Antikörper, welcher an das V5-Epitop des rekombinaten Proteins bindet, detektiert (Tab. 3-2).

ZKÜ	rWT-TFPI-1								[P151L]TFPI-1							
	1 T		2 T		5 T		6 T		1 T		2 T		5 T		6 T	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	96 h	24 h	96 h
-	+	+	+/-	+	+	++	+	++	+	+	+/-	+	+	++	+	++

**Tab. 3-2:** *Dot-Blot-ELISA*: Nachweis des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante. Es wurden 4 verschiedene Transfektionsansätze untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden nach 24, 48 und 96 h entnommen und ~20-fach aufkonzentriert. Nach erfolgter Farbreaktion wurde die Farbintensität von - (nicht sichtbar) bis +++ (intensive Farbbildung) eingeteilt. T: Transfektion.

Um die Spezifität der Reaktion sicherzustellen, wurde in einem weiteren ELISA ein Kaninchen Anti-human-TFPI-1 Primärantikörper und ein Ziege Anti-Kaninchen-HRP Sekundärantikörper verwendet. Im Test konnte das gleiche Ergebnis mit vergleichbaren Farbintensitäten nachgewiesen werden. Beide Verfahren weisen die Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante nach. Zellkulturüberstände, die nach 96 h entnommen wurden, zeigten im ELISA eine höhere Farbintensität, als nach 24 und 48 h.

### 3.1.5.2. Quantitativer Gesamt-TFPI-1 Nachweis

Die Expression des rWT-TFPI-1 und der r[P151L]TFPI-1-Mutante konnte nachgewiesen werden (Tab. 3-3). Für die Kontrollen, Zellkulturüberstände von nicht transfizierten *High Five*-Zellen und Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-CAT transfiziert wurden, lag die TFPI-Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Die maximale Konzentration des rWT-TFPI-1 im Zellkulturüberstand beträgt 4,82 ng/ml und für die r[P151L]TFPI-1-Mutante 6,41 ng/ml.

Probe	ZKÜ nach 8 h	ZKÜ nach 96 h
rWT-TFPI-1	0,59 ng/ml	4,82 ng/ml
r[P151L]TFPI-1	0,74 ng/ml	6,41 ng/ml
rCAT	n. n.	n. n.
nicht-transfizierter ZKÜ	n. n.	-

**Tab. 3-3:** Gesamt-TFPI-1 ELISA: Bestimmung der Konzentration des rWT-TFPI-1 und der [P151L]TFPI-1-Mutante im Zellkulturüberstand von *High Five*-Insektenzellen nach 8 und 96 h Inkubationsdauer. Für die Kontrollen, Zellkulturüberstand von Zellen, die mit dem Vektor pMIB-V5-CAT transfiziert wurden und nicht-transfizierter Zellkulturüberstand, lag die TFPI-Expression unterhalb der Nachweisgrenze (n. n.; Nachweisgrenze 0,18 ng/ml). ZKÜ: Zellkulturüberstand.

**3.1.5.3. Quantitativer Bestimmung der TFPI-1-Aktivität**

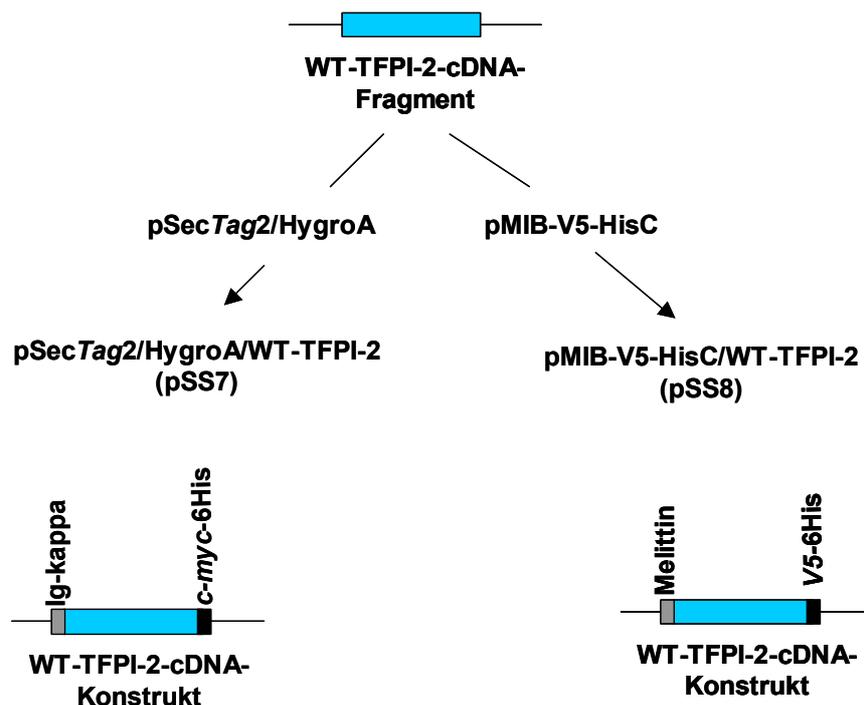
Sowohl für rWT-TFPI-1 als auch für r[P151L]TFPI-1-Mutante konnte TFPI-Aktivität nachgewiesen werden. Zellkulturüberstände von nicht transfizierten Zellen, und Zellen, die mit dem Vektor (pMIB-V5-CAT) transfiziert wurden, zeigen keine inhibitorische Aktivität (Negativkontrolle). Die im Aktivitätstest ermittelten Werte lagen für rWT-TFPI-1 bei 0,011 U/ng und für r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 0,016 U/ng. Die Aktivität von nativem humanen TFPI im Blutplasma beträgt 0,018 U/ng. Die relative Aktivität des rWT-TFPI-1 lag bei 61% der Aktivität von nativem TFPI und für r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 89%.

### 3.2. Klonierung des WT-TFPI-2 und Expression in Säuger- und Insektenzellen

#### Strategie zur Klonierung des WT-TFPI-2

Die Klonierung des WT-TFPI-2 in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC erfolgte analog zur TFPI-1 Klonierung.

1. Amplifizierung der WT-TFPI-2-cDNA aus dem IMAGE-Klon ID:6718236 und Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor.
2. Klonierung des WT-TFPI-2-cDNA-Fragments ohne Start- und ohne Stopkodon in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC (Abb. 3-6).



**Abb. 3-6:** Strategie für die Klonierung der WT-TFPI-2-cDNA in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC. Dargestellt sind die WT-TFPI-2-cDNA-Konstrukte mit den Nukleotidsequenzen für das Sekretionssignal und das Tag.

Ig-kappa: Sequenz für das Ig-Kappa-Kettenleitsignal

c-myc-6His: Sequenz für das c-myc-Epitop und das 6-Histidin-Tag

HBM (*Honeybee melittin secretion signal*): Sequenz für das Sekretionssignal der Honigbiene

V5-6His: Sequenz für das V5-Epitop und das 6-Histidin-Tag

### 3.2.1. Klonierung in den Vektor pSecTag2/HygroA

Mit den Primern MamTFPI-2BamHI und MamTFPI-2XhoI, die Schnittstellen für *BamHI* bzw. *XhoI* enthalten, wurde die WT-TFPI-2-cDNA aus dem IMAGE-Klon ID:6718236 amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (Abb. 3-7).

```

1  ATGGACCCCG CTCGCCCCCT GGGGCTGTCG ATTCTGCTGC TTTTCCTGAC
51  GGAGGCTGCA CTGGGCGATG CTGCTCAGGA GCCAACAGGA AATAACGCGG
101 AGATCTGTCT CCTGCCCTTA GACTACGGAC CCTGCCGGGC CCTACTTCTC
151 CGTTACTACT ACGACAGGTA CACGCAGAGC TGCCGCCAGT TCCTGTACGG
201 GGGCTGCGAG GGCAACGCCA ACAATTTCTA CACCTGGGAG GCTTGCGACG
251 ATGCTTGCTG GAGGATAGAA AAAGTTCCCA AAGTTTGCCG GCTGCAAGTG
301 AGTGTGGACG ACCAGTGTGA GGGGTCCACA GAAAAGTATT TCTTTAATCT
351 AAGTTCCATG ACATGTGAAA AATTCTTTTC CGGTGGGTGT CACCGGAACC
401 GGATTGAGAA CAGGTTTCCA GATGAAGCTA CTTGTATGGG CTTCTGCGCA
451 CCAAAGAAAA TTCCATCATT TTGCTACAGT CCAAAGATG AGGACTGTG
501 CTCTGCCAAT GTGACTCGCT ATTATTTTAA TCCAAGATAC AGAACCTGTG
551 ATGCTTTCAC CTATACTGGC TGTGGAGGGA ATGACAATAA CTTTGTTAGC
601 AGGGAGGATT GCAAACGTGC ATGTGCAAAA GCTTTGAAAA AGAAAAAGAA
651 GATGCCAAAG CTTGCTTTG CCAGTAGAAT CCGGAAAATT CGGAAGAAGC
701 AATTTTAA

```

**Abb. 3-7:** Nukleotidsequenz der WT-TFPI-2-cDNA. Die Sequenz des Sekretionssignals ist unterstrichen, Start- und Stopkodon sind umrandet.

Mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* wurde die WT-TFPI-2-cDNA (~646 bp) aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor restringiert. Die Plasmid-DNA des Vektors pSecTag2/HygroA (5,7 kbp) wurde ebenso geschnitten. Beide Restriktionsansätze wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert. Nach der Ligation wurden *E.coli TOP 10*-Zellen transformiert. In einer Kolonie-PCR mit einem *T7Promotor*- und einem pcDNA3.1/BGHreverse-Primer wurde die erfolgreiche Insertion überprüft. Die korrekte Insertion der WT-TFPI-2-cDNA im richtigen Leserahmen, ohne Start- und ohne Stopkodon, wurde mittels Sequenzierung bestätigt und das Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 wurde pSS7 genannt.

### 3.2.2. Klonierung in den Vektor pMIB-V5-HisC

Die WT-TFPI-2-cDNA wurde mit den Primern InsTFPI-2BamHI und InsTFPI-2XhoI aus dem IMAGE-Klon ID:6718236 amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert. Die WT-TFPI-2-cDNA wurde aus dem Vektor restringiert und im Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Der Expressionsvektor pMIB-V5-HisC (3,5 kbp) wurde ebenso gespalten und aufgereinigt.

Das TFPI-2-Insert und die Plasmid-DNA des linearisierten Expressionsvektors wurden aus dem Gel eluiert und in die Ligation eingesetzt. Es wurden *E.coli TOP 10*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert.

In einer Kolonie-PCR mit einem *OpIE2Forward*- und einem *OpIE2Reverse*-Primer wurden die Klone auf eine erfolgreiche Insertion der WT-TFPI-2-cDNA überprüft. Die korrekte Insertion der WT-TFPI-2-cDNA im richtigen Leserahmen, ohne Start- und ohne Stopkodon, wurde mittels Sequenzierung bestätigt und das Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 wurde pSS8 genannt.

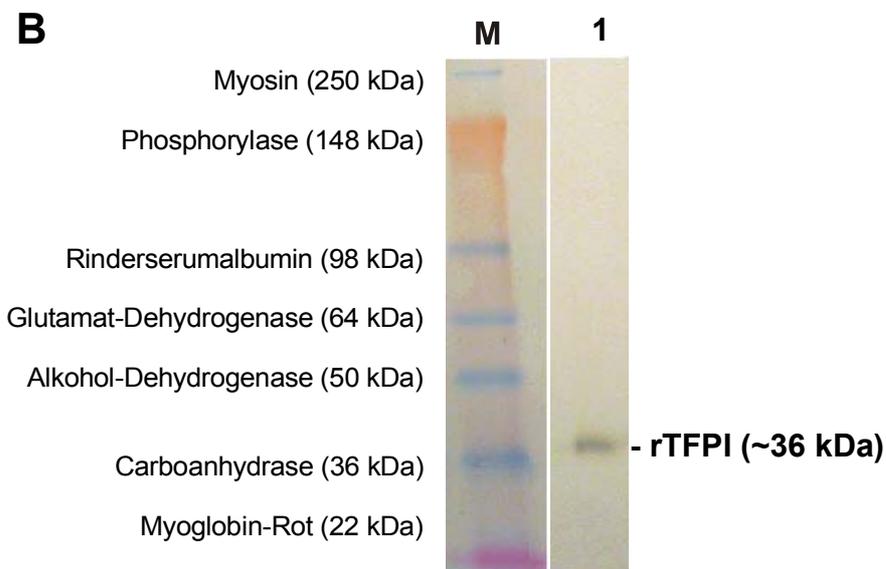
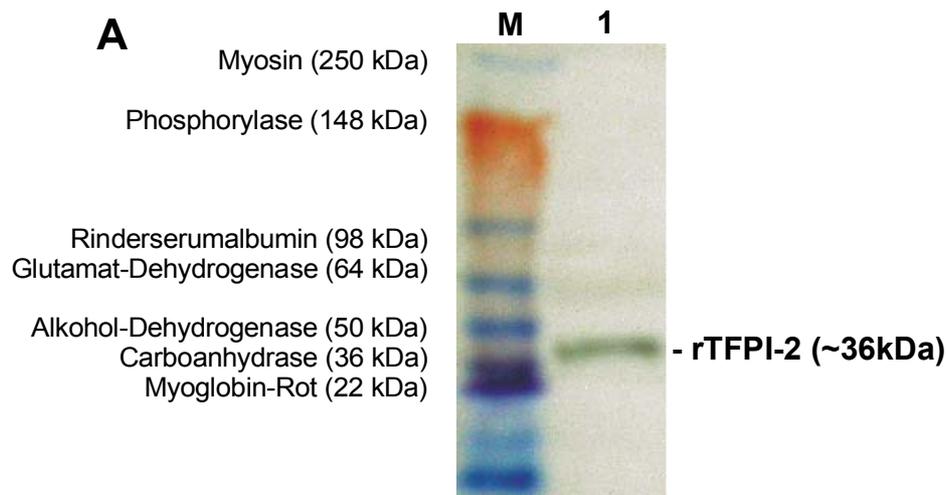
### 3.2.3. Expression des rWT-TFPI-2 in Säuger- und Insektenzellen

COS-1-Säugerzellen und *High Five*-Insektenzellen wurden ebenso, wie bereits für TFPI-1 beschrieben, mit pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 (pSS7) und pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 (pSS8) transfiziert. Bei der Transfektion der COS-1-Zellen wurde nach 24 h Stunden das serumhaltige-Medium gegen serumfreies- ausgetauscht. Die Zellkulturüberstände wurden nach 48 und 72 h entnommen und ~50-fach aufkonzentriert.

#### 3.2.3.1. Nachweis des rWT-TFPI-2 im *Western Blot*

Die Expression des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von Insekten- und Säugerzellen wurde im *Western Blot* nachgewiesen. *SeeBlue<sup>®</sup>Plus2-PreStained Protein Standard* wurde als Marker eingesetzt. Für die Detektion wurde ein 1:1000 verdünnter Anti-His (C-term.)-HRP- bzw. ein Anti-V5-HRP-gekoppelter Antikörper verwendet.

Rekombinant in COS-1-Zellkulturüberstand exprimiertes WT-TFPI-2, enthält ein Ig-Kappa-Leitsignal und C-terminal ein *c-myc*-Epitop und ein 6-His-Tag. Der rekombinant in *High-Five*-Insektenzellkulturüberstand exprimierte WT-TFPI-2 enthält eine Mellitin-Sekretionssignal und C-terminal ein V5-Epitop und ein 6-His-Tag. Beide sekretorisch exprimierten Proteine haben ein Molekulargewicht von ~ 36 kDa (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8:** *Western Blot*: Nachweis des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von Säuger- und Insektenzellen.

**A:** Für die Detektion des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen wurde ein Anti-His (C-term.)-HRP-gekoppelter Antikörper (1:1000 verdünnt) verwendet.

Marker: Proteinlängenstandard

Spur 1: Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen mit rWT-TFPI-2 (~50-fach aufkonzentriert)

**B:** Für die Detektion des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von *High-Five*-Insektenzellen wurde ein Anti-V5-HRP-gekoppelter Antikörper (1:1000 verdünnt) verwendet.

Marker: Proteinlängenstandard

Spur 1: Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen mit rWT-TFPI-2 (~50-fach aufkonzentriert)

### **3.3. Funktionelle Untersuchung des rekombinanten WT-TFPI-2**

Für alle Untersuchungen wurden der rWT-TFPI-2 aus nicht-aufgereinigtem COS-1- bzw. *High Five*-Zellkulturüberstand verwendet. Alle Zellkulturüberstände einschließlich der Negativkontrollen wurden ~50-fach aufkonzentriert.

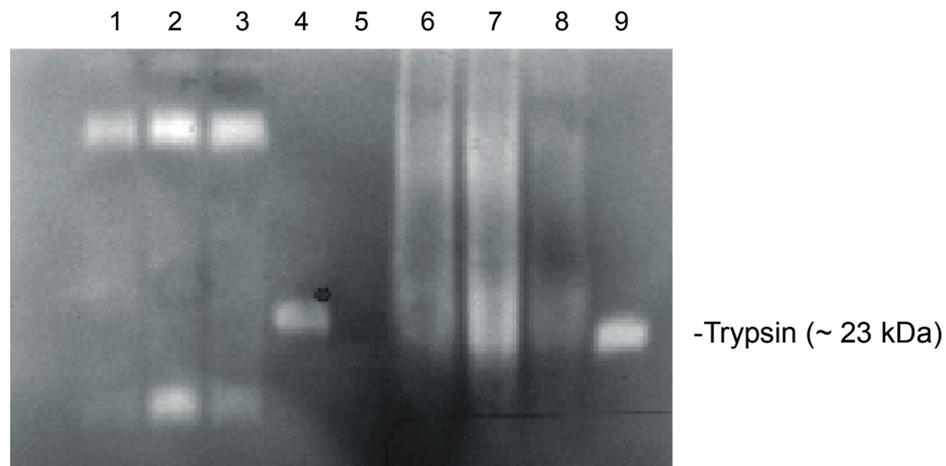
#### **3.3.1. Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 mittels reverser Zymografie**

TFPI-2 hemmt verschiedene Serinproteinasen, unter anderem auch Trypsin (Peterson *et al.*, 1996). Die inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 wurde in einem reversen Zymogramm mit Casein als Substrat untersucht. Zunächst wurde in einem Titrationsgel eine geeignete Trypsinkonzentration von 0,01 µg/µl ermittelt, bei der Casein als Substrat abgebaut wird, erkennbar an einer entfärbten hellen Bande.

Der ~50-fach aufkonzentrierte Inhibitor-haltige Zellkulturüberstand mit rWT-TFPI-2 (Spur 2 und 7) wurde gemeinsam mit Trypsin elektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrollen wurden nicht-transfizierte Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen (Spur 1) und von *High Five*-Zellen (Spur 5) eingesetzt. Des weiteren wurden Zellkulturüberstände (Spur 3 und 8) von Zellen, die mit den Basisvektoren pSecTag2/HygroA bzw. pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, verwendet. Diese Negativkontrollen wurden mit Trypsin versetzt und aufgetragen.

Das Medikament Trasylol wurde als Kontrolle für den Test eingesetzt. Es enthält als Wirkstoff Aprotinin (mit 500000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten), ein aus der Rinderlunge gewonnenes Polypeptid bestehend aus 58 Aminosäuren. Durch Bindung reversibler stöchiometrischer Enzym-Inhibitor-Komplexe wirkt Aprotinin als Hemmstoff von Trypsin, Plasmin, sowie Plasma- und Gewebekallikrein.

Die Kontrolle (Spur 4 und 9) zeigte, dass entweder die eingesetzte Aprotininkonzentration von 1,40 µg/µl zu gering war, oder die Bindung an Trypsin reversibel war, erkennbar am proteolytischen Caseinabbau (Abb. 3-9). Die Negativkontrollen (Spur 1, 3, 6 und 8) sollten auf Höhe des Trypsins Casein abbauen. Die Tatsache, dass hier keine entfärbten Banden erkennbar waren, lässt die Vermutung zu, dass im Zellkulturüberstand von *High Five*-Insektenzellen und von COS-1-Säugerzellen ein Trypsininhibitor enthalten war. Da in den verwendeten Zellkulturmedien kein Trypsininhibitor enthalten war, produzieren die Zellen diesen selbst. Über die inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 auf Trypsin kann daher keine Aussage getroffen werden.



**Abb. 3-9:** Reverses Zymogramm mit Casein als Substrat: Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften des rWT-TFPI-2 auf Trypsin. Trasyolol, ein aprotininhaltiges Medikament, wurde als Kontrolle für den Test eingesetzt. Aprotinin hemmt Trypsin und es sollte daher kein Casein abgebaut werden (Spur 4 und 9). Als Kontrollen (Spur 1, 3, 6, 8) wurde Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten Zellen und von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA bzw. *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, eingesetzt. In den Ansätzen sollte Casein auf Höhe des Trypsins proteolytisch abgebaut werden.

1: Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten COS-1-Zellen.

2: Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid SecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden.

3: Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA transfiziert wurden.

4: Trasyolol

5: -

6: Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten *High Five*-Zellen.

7: Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden.

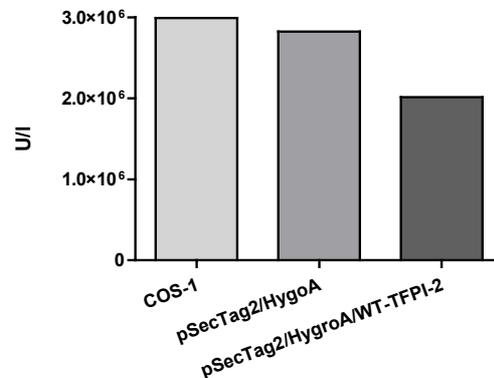
8: Zellkulturüberstand von Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC transfiziert wurden.

9: Trasyolol

### 3.3.2. Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des rWT-TFPI-2 im chromogenen Substrattest

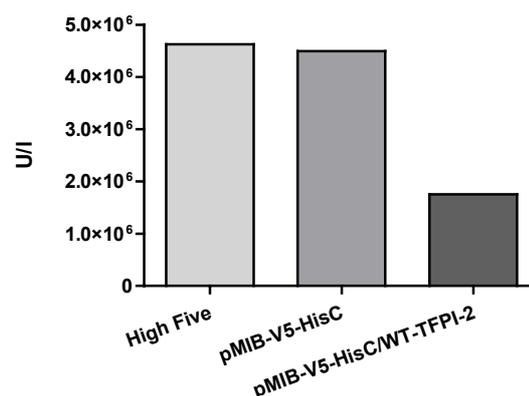
Die inhibitorische Aktivität des rWT-TFPI-2 wurde mit einem Test ermittelt, der das freigesetzte p-Nitroanilin, aus der Spaltung des chromogenen Substrates mit aktivem Chymotrypsin, bestimmt. Es wurde Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 und von *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände von Zellen, die mit den Basisvektoren ohne *Insert* transfiziert wurden, eingesetzt.

Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, zeigte eine um 31% verminderte Chymotrypsin-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle pSecTag2/HygroA (Abb. 3-10).



**Abb.3-10:** Bestimmung der Chymotrypsin-Aktivität (U/l) im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen. Als Kontrollen wurden Zellkulturüberstände von nicht-transfizierten COS-1-Zellen und von Zellen, die mit dem Vektor pSecTag2/HygroA transfiziert wurden, verwendet. Der Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen, transfiziert mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 zeigte eine verminderte Chymotrypsin-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen.

Der Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, zeigte eine um 62% verminderte Chymotrypsin-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle pMIB-V5-HisC (Abb. 3-11).



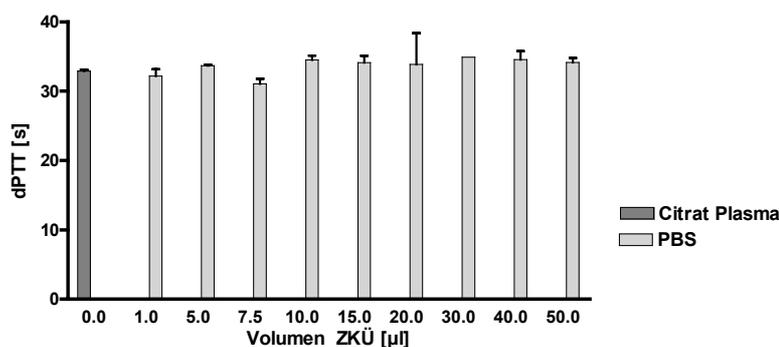
**Abb.3-11:** Bestimmung der Chymotrypsin-Aktivität (U/l) im Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen. Als Kontrollen wurden Zellkulturüberstände von nicht-transfizierten *High Five*-Zellen und von Zellen, die mit dem Vektor pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, verwendet. Der Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen, transfiziert mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 zeigte eine verminderte Chymotrypsin-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen.

### 3.3.3. Modifizierte PTT: Nachweis der antikoagulatorischen Aktivität des rWT-TFPI-2

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ist ein globaler Test, der die Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI, XII, Präkallikrein und *High molecular weight* Kininogen im endogenen Gerinnungssystem erfasst. Die PTT des verwendeten Citratplasmas von gesunden Blutspendern lag mit einem Messwert von 33 s im Referenzbereich (26-36 s).

Um die antikoagulatorische Aktivität von rWT-TFPI-2 zu bestimmen, wurden zwei modifizierte verdünnte Thromboplastinzeiten (*diluted Thromboplastin time*, dPTT) bestimmt, einmal mit rWT-TFPI-2-haltigem Zellkulturüberstand und einmal ohne rWT-TFPI-2.

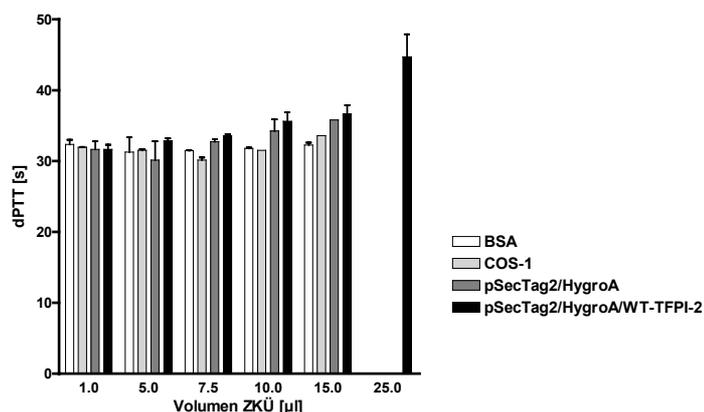
In einem Vorversuch wurde der Einfluss des Verdünnungseffekts auf die dPTT untersucht. Es wurden 1-50 µl PBS zum Testansatz gegeben (Abb. 3-12). Alle Messwerte lagen mit 32 bis 35 s im Referenzbereich, d.h. der Verdünnungseffekt war vernachlässigbar.



**Abb. 3-12:** Modifizierte PTT: Einfluss des Verdünnungseffektes auf die partielle Thromboplastinzeit nach Zugabe von 1-50 µl PBS. Alle Messungen wurden in Zweifachbestimmung durchgeführt, alle Messwerte lagen im Referenzbereich von 26 bis 36 s.

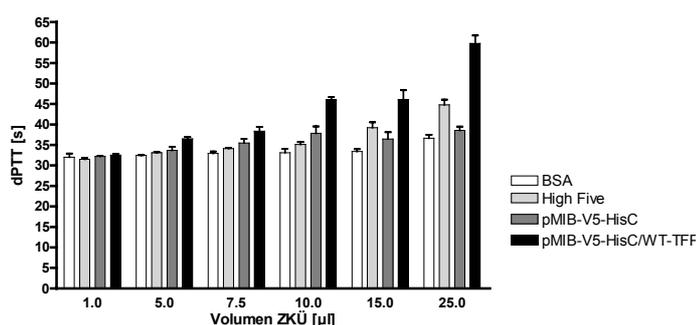
Es wurden Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände von nicht-transfizierten COS-1-Zellen und von Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA transfiziert wurden, verwendet. Als weitere Kontrolle wurde eine äquivalente Konzentration von BSA zum Testansatz gegeben, um den Einfluss der Proteinkonzentration zu berücksichtigen.

Es wurde eine minimal verlängerte dPTT für COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, nachgewiesen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3-13).



**Abb. 3-13:** Modifizierte PTT: Nachweis der antikoagulatorischen Aktivität von rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen. Es wurden Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, untersucht. Als Kontrollen wurde Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten COS-1-Zellen und von Zellen, die mit dem Basisvektor pSecTag2/HygroA transfiziert wurden, verwendet. Die Messwerte zeigten eine minimal verlängerte dPTT für Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, im Vergleich zu den Kontrollen. Der Unterschied war nicht signifikant.

Es wurden Zellkulturüberstände von *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände von nicht-transfizierten *High Five*-Zellen und von Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, verwendet. Es wurde eine minimal verlängerte dPTT für *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, nachgewiesen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3-14). Bereits ab einer Volumenzugabe von 10 µl rWT-TFPI-2-haltigem Zellkulturüberstand war dieser Effekt erkennbar ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 3-14:** Modifizierte PTT: Nachweis der antikoagulatorischen Aktivität von rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von *High Five*-Zellen. Es wurden Zellkulturüberstände von *High Five*-Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, untersucht. Als Kontrollen wurde Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten *High Five*-Zellen und von Zellen, die mit dem Basisvektor pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, verwendet. Die Messwerte zeigten eine minimal verlängerte dPTT für Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC/WT-TFPI-2 transfiziert wurden, im Vergleich zu den Kontrollen ( $p < 0,01$ ).

### 3.4. Untersuchung der TFPI-Gene auf genetische Variationen mittels DHPLC

Für die DHPLC-Analyse der TFPI-Gene wurden juvenile Apoplex-Patienten und Patienten nach einer *Stent*-Implantation untersucht.

#### 3.4.1. Untersuchung von juvenilen Apoplex-Patienten auf Risikofaktoren für venöse Thrombose und Myokardinfarkt

Es wurden 41 Patienten (Durchschnittsalter 38 Jahre, S.D. 10,2; 16 Männer, 25 Frauen) nach ischämischen Schlaganfall ausgewählt, die jünger als 50 Jahre alt sind. Die Diagnose wurde nach den Kriterien der WHO erstellt (Hatano, 1976).

Die Apoplex-Patienten wurden molekulargenetisch auf Risikofaktoren für venöse Thrombose und Myokardinfarkt untersucht (Tab. 3-4). Die Ergebnisse der untersuchten Patienten entsprachen alle dem WT für Faktor V1691-(Leiden)-, Prothrombin 20210- und [P151L]TFPI-1-Mutation. Des Weiteren wurden alle Patienten auf die Faktor VII (R353Q)-Mutation untersucht. Ein Nukleotidaustausch im Kodon 353 des Faktor VII-Gens führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Glutamat an Position 353 des Proteins. Der QR- und der QQ-Genotyp sind, im Vergleich zum Wildtyp mit einer Reduktion der FVII-prokoagulatorischen Aktivität assoziiert und mindern das Risiko für einen Myokardinfarkt (Girelli *et al.*, 2000). In unserer Studie waren 2,4% der Patient homozygot für das Q-Allel, 17,1% waren heterozygot (RQ) und 80,5% waren homozygot für das R-Allel.

#### juvenile Apoplex-Patienten

Patienten-Nr.	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter	FV-Mut. <sup>2</sup>	Prothr. -Mut. <sup>3</sup>	TFPI-Mut. <sup>4</sup>	FVII-Mut. <sup>5</sup>
44	m	43	WT	WT	WT	RR
78	w	42	WT	WT	WT	RQ
90	m	41	WT	WT	WT	RQ
98	w	40	WT	WT	WT	RR
102	w	42	WT	WT	WT	RR
104	m	35	WT	WT	WT	RQ
116	m	17	WT	WT	WT	RR
131	w	18	WT	WT	WT	RR
134	m	48	WT	WT	WT	RR
135	w	18	WT	WT	WT	RR
137	w	48	WT	WT	WT	RQ
140	m	48	WT	WT	WT	RR
142	m	42	WT	WT	WT	RR
154	m	44	WT	WT	WT	RR
175	w	46	WT	WT	WT	RR

Patienten-Nr.	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter	FV-Mut. <sup>2</sup>	Prothr. -Mut. <sup>3</sup>	TFPI-Mut. <sup>4</sup>	FVII-Mut. <sup>5</sup>
176	w	40	WT	WT	WT	RR
180	m	48	WT	WT	WT	RR
191	w	36	WT	WT	WT	RR
195	m	47	WT	WT	WT	RR
205	w	27	WT	WT	WT	RR
229	m	37	WT	WT	WT	RR
231	m	42	WT	WT	WT	RR
236	w	49	WT	WT	WT	RQ
239	m	41	WT	WT	WT	RR
245	w	49	WT	WT	WT	RR
248	w	32	WT	WT	WT	RQ
251	w	38	WT	WT	WT	RR
259	w	38	WT	WT	WT	RR
278	w	26	WT	WT	WT	RR
279	m	48	WT	WT	WT	RR
282	w	29	WT	WT	WT	RR
283	w	49	WT	WT	WT	RQ
303	w	21	WT	WT	WT	RR
311	m	35	WT	WT	WT	RR
320	m	47	WT	WT	WT	RR
321	w	47	WT	WT	WT	RR
324	w	35	WT	WT	WT	QQ
325	w	16	WT	WT	WT	RR
327	w	26	WT	WT	WT	RR
328	w	24	WT	WT	WT	RR
329	w	23	WT	WT	WT	RR

**Tab. 3-4:** Untersuchung von juvenilen Apoplex-Patienten auf Faktor V-1691-(Leiden)-, Faktor VII (R353Q)-, Prothrombin 20210- und [P151L]TFPI-1-Mutation.

<sup>1</sup> Geschlecht, m: männlich, w: weiblich

<sup>2</sup> FV-1691-(Leiden)-Mutation, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom. mut.: homozygot

<sup>3</sup> Prothrombin 20210-Mutation, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom. mut.: homozygot

<sup>4</sup> [P151L]TFPI-1-Mutation, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom. mut.: homozygot

<sup>5</sup> Faktor VII (R353Q)-Mutation, R-Allel, RR: homozygot, RQ: heterozygot, QQ: homozygot

### 3.4.2. Untersuchung von Patienten nach *Stent*-Implantation auf Risikofaktoren für koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt und Restenose

Es wurden Patienten des Herz- und Diabeteszentrums NRW ausgewählt, bei denen ein *Stent*, eine drahtgestützte Prothese, in die Schlagader des Herzens eingesetzt wurde. Alle 108 Patienten (Durchschnittsalter 64 Jahre, S.D. 8,8; 94 Männer, 14 Frauen) wurden molekulargenetisch auf Risikofaktoren für Restenose, koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt untersucht (Tab. 3-5).

## Patienten nach Stent-Implantation

Nr.	Geschlecht <sup>0</sup>	Alter	Fibrinogen -455G>A <sup>1</sup>	GPIIa (PIA; HPA-A1/A2)- Genotyp <sup>2</sup>	FVII RQ353 <sup>3</sup>	PAI 4G/5G <sup>4</sup>	TFPI -399C>T <sup>5</sup>	FVII I/D -323 <sup>6</sup>
1	m	74	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
2	m	48	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
3	m	70	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
4	m	65	het	A1/A1	RR	5G	het	D/D
5	m	60	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
6	m	76	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
7	m	60	het	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
8	w	67	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
9	m	79	het	A1/A2	RQ	4G	WT	I/D
10	m	70	WT	A1/A2	RR	4G	het	D/D
11	m	62	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
12	m	49	WT	A1/A1	RR	5G	het	D/D
13	m	81	het	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
14	m	69	hom mut	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
15	m	69	het	A1/A1	RQ	4G	WT	I/D
16	m	68	het	A1/A1	RR	5G	WT	D/D
17	m	49	WT	A1/A2	RR	5G	WT	I/I
18	m	67	hom mut	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
20	m	60	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
21	m	57	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
22	m	71	WT	A1/A2	RR	4G/5G	het	D/D
23	w	47	hom mut	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
24	m	69	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
25	m	67	het	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
26	m	71	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
27	m	69	het	A1/A2	RR	5G	WT	D/D
28	m	67	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
29	m	52	het	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
31	m	71	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
32	m	63	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
33	m	60	WT	A2/A2	RR	4G/5G	hom mut	D/D
34	m	73	het	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
35	m	65	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
36	m	67	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
37	m	68	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
38	m	70	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
39	m	67	het	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
40	m	77	WT	A1/A2	RR	5G	WT	D/D
41	m	80	het	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
42	m	62	het	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
43	w	76	het	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
48	w	72	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
49	m	67	het	A1/A1	RR	5G	WT	D/D
50	m	49	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
51	m	62	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
52	m	42	WT	A1/A2	RQ	4G	WT	I/D
53	w	58	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
54	m	67	het	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
55	m	52	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
56	m	61	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
57	m	62	WT	A1/A2	RQ	4G/5G	WT	I/D
58	m	72	hom mut	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
59	w	65	het	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
60	m	76	WT	A1/A1	RR	5G	het	D/D
61	m	50	WT	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
63	m	64	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
64	m	68	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
65	m	64	WT	A1/A1	QQ	4G/5G	WT	I/I
66	m	64	WT	A1/A2	RR	4G/5G	het	D/D
67	m	64	het	A1/A1	RR	4G	het	D/D
68	w	61	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
69	m	67	het	A1/A1	RR	5G	WT	D/D
70	m	40	het	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	I/D
71	m	60	het	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
72	m	67	het	A1/A2	RR	4G/5G	het	D/D

Nr.	Geschlecht <sup>0</sup>	Alter	Fibrinogen -455G>A <sup>1</sup>	GPIIa (PIA; HPA-A1/A2)- Genotyp <sup>2</sup>	FVII RQ353 <sup>3</sup>	PAI 4G/5G <sup>4</sup>	TFPI -399C>T <sup>5</sup>	FVII I/D -323 <sup>6</sup>
73	m	61	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
74	m	55	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
75	m	52	WT	A1/A1	RQ	4G	WT	D/D
76	m	49	WT	A1/A2	RQ	5G	hom mut	I/D
77	m	65	WT	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
78	m	79	het	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
79	m	59	het	A1/A1	RR	4G	het	D/D
80	m	74	WT	A1/A1	RQ	4G	het	I/D
81	m	75	het	A1/A1	RR	5G	WT	D/D
82	w	42	WT	A1/A1	RQ	4G/5G	WT	D/D
83	m	58	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
84	m	69	WT	A1/A1	QQ	4G	WT	D/D
85	m	48	WT	A1/A2	RQ	4G/5G	WT	I/D
86	m	68	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
87	m	56	WT	A1/A1	RQ	5G	het	I/D
88	m	58	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
89	m	53	WT	A1/A1	RQ	5G	WT	I/D
90	m	70	WT	A1/A1	RR	5G	het	D/D
92	m	56	WT	A1/A1	RQ	4G	WT	I/D
93	m	65	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
94	m	70	WT	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
95	w	80	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
96	m	69	WT	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
97	m	61	het	A2/A2	RR	4G	WT	D/D
98	m	65	het	A1/A2	RR	4G	het	D/D
99	w	71	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
100	m	70	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
101	m	55	WT	A1/A1	RQ	5G	het	I/D
102	m	77	WT	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
103	m	70	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D
104	m	67	WT	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
105	w	66	het	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
106	w	69	WT	A1/A2	RR	4G/5G	WT	D/D
107	m	71	het	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
108	m	63	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
109	m	77	hom mut.	A1/A1	RR	4G	het	D/D
110	m	61	WT	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
111	m	64	het	A1/A1	RR	4G/5G	het	D/D
112	m	71	WT	A1/A1	RR	5G	het	D/D
114	w	58	WT	A1/A1	RR	4G/5G	WT	D/D
115	w	67	het	A1/A2	RR	4G	WT	D/D
116	m	67	WT	A1/A1	RR	5G	het	D/D
117	m	70	WT	A1/A1	RR	4G	WT	D/D

**Tab. 3-5:** Untersuchung von Patienten nach einer *Stent*-Implantation auf Risikofaktoren für koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt und Restenose.

0 Geschlecht, m: männlich, w: weiblich

1  $\beta$ -Fibrinogen-Promotor -455G>A-Mutation, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom mut.: homozygot

2 GPIIa (PAI, HPA-A1/A2)-Genotyp, A1A1-, A1A2- und A2A2-Genotyp

3 FVII R353Q-Mutation, R-Allel, RR: homozygot, RQ: heterozygot, QQ: homozygot

4 PAI 4G/5G-Polymorphismus, 4G-, 4G/5G und 5G-Polymorphismus

5 TFPI -399C>T, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom. mut.: homozygot

6 FVII I/D -323, I: Insertion, D: Deletion

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung der Patienten nach *Stent*-Implantation sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

Fibrinogen -455G>A <sup>1</sup>			GPIII (PIA; HPA-A1/A2)-Genotyp <sup>2</sup>			FVII R353Q <sup>3</sup>			PAI 4G/5G <sup>4</sup>			TFPI -399C>T <sup>5</sup>			FVII I/D -323 <sup>6</sup>		
WT	het	hom	A1/A1	A1/A2	A2/A2	RR	RQ	QQ	4G	4G/5G	5G	WT	het	hom	D/D	I/D	I/I
66	37	5	81	25	2	84	23	1	33	58	17	78	28	2	86	20	2
61%	34%	5%	75%	23%	2%	78%	21%	1%	30%	54%	16%	72%	26%	2%	80%	18%	2%

**Tab. 3-6:** Molekulargenetische Charakterisierung der Patienten nach einer *Stent*-Implantation auf Risikofaktoren für koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt und Restenose. Angegeben ist die Häufigkeit der untersuchten Mutationen im Kollektiv.

1  $\beta$ -Fibrinogen-Promotor -455G>A-Mutation, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom mut.: homozygot

2 GPIIIa (PAI, HPA-A1/A2)-Genotyp, A1A1-, A1A2- und A2A2-Genotyp

3 FVII R353Q-Mutation, R-Allel, RR: homozygot, RQ: heterozygot, QQ: homozygot

4 PAI 4G/5G-Polymorphismus, 4G-, 4G/5G und 5G-Polymorphismus

5 TFPI -399C>T, WT: Wildtyp, het: heterozygot, hom. mut.: homozygot

6 FVII I/D -323, I: Insertion, D: Deletion

Die Untersuchung des Polymorphismus -455G>A im  $\beta$ -Fibrinogen-Promotor zeigte, dass 61% der Patienten dem WT entsprachen, 34% waren heterozygot und 5% homozygot. Das A-Allel wird mit einer erhöhten Fibrinogenkonzentration assoziiert und ist einer japanischen Studie zufolge ein unabhängiger Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall (Thomas, *et al.*, 1991; Nishiuma *et al.*, 1998). In einer dänischen Studie konnte gezeigt werden, dass die -455G>A Mutation in der Promotorregion des  $\beta$ -Fibrinogen-Gens mit einem erhöhten Plasma-Fibrinogen-Wert für Männer und Frauen assoziiert ist, aber keine ischämische Herzerkrankung verursacht (Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1997). Die Genotyp-Verteilung (Frauen: 63% G/G, 34% G/A, 4% A/A und Männer: GG 64%, G/A 31%, A/A 4%) war vergleichbar mit unserer Studie.

GPIIIa, die  $\beta$ -Untereinheit des Fibrinogen-Rezeptors, wurde auf den PI A1/A2-Polymorphismus untersucht, der mit einem erhöhten Risiko für Restenose nach einer *Stent*-Implantation assoziiert ist. Es gibt 2 serologisch definierte allelische Formen des Plättchen-spezifischen Alloantigens PI(A):PI(A1) und PI(A2), beide sind auf dem GPIIIa-Molekül lokalisiert. Wird das PI(A1)-Antigen nicht exprimiert, dann ist GPIIIa vermindert oder fehlt ganz (Kunicki *et al.*, 1981). Es waren 23% der Patienten heterozygot für das A1/A2-Allel, 75% waren homozygot für A1 und 2% homozygot für A2. In einer Studie wurden in 1051 Patienten mit Typ-2 Diabetes (PIA1/A1 71,4%; PIA1/A2 26%,; PIA2/A2 2,7%) und 2247 ohne Typ-2 (PIA1/A1 71,6%; PIA1/A2 25,7%,; PIA2/A2 2,8%) eine vergleichbare Genotyp-Verteilungen gefunden. Das PIA2-Allel wurde nicht mit einem erhöhten Risiko für Typ-2 Diabetes, koronare Herzerkrankung oder Myokardinfarkt assoziiert (März *et al.*, 2004).

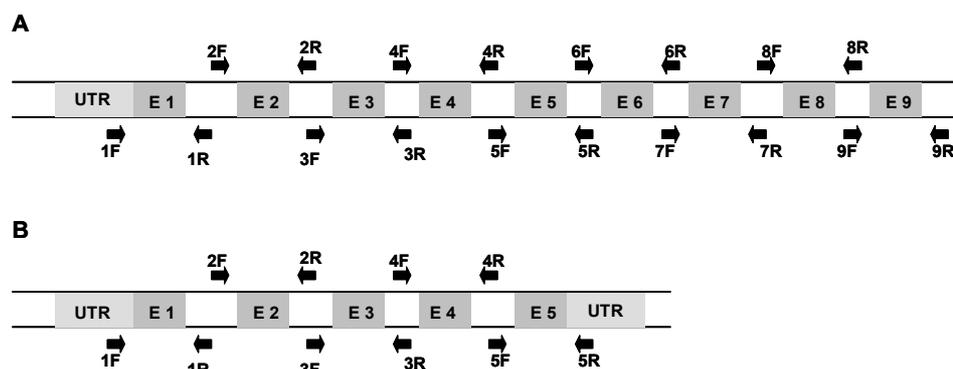
Das Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Gen wurde auf einen PAI 4G-/5G-Polymorphismus untersucht. Der 4G-Polymorphismus wird mit einer erhöhten PAI-1-Konzentration assoziiert und ist daher ein weiterer Risikofaktor für koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt (Margaglione *et al.*, 1998). In unserer Studie waren 54% der Patienten heterozygot für den 4G/5G-Polymorphismus, 30% homozygot für 4G und 16% homozygot für 5G. In einer schwedischen Studie wurden für Patienten jünger als 45 Jahre nach Myokardinfarkt folgende Allel-Frequenzen (4G/4G 43%; 4G/5G 41%; 5G/5G 16%) detektiert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (4G/4G 26%; 4G/5G 54%; 5G/5G 20%) Die Prävalenz des 4G-Allels war für die Patienten nach Myokardinfarkt signifikant größer (Eriksson *et al.*, 1995)

Die genetische Variation -399C>T in der Promotorregion des TFPI-1-Gens wurde ebenfalls untersucht. Es waren 26% der Patienten heterozygot für den Polymorphismus, 2% waren homozygot für TT und 72% der Patienten waren homozygot für CC. In einer japanischen Studie wurde der Genotyp von Patienten mit venöser Thrombose (CC 48,6%; CT 41,4%; TT 10%) mit gesunden Kontrollpersonen (CC 51,0%; CT 37,6%; TT 11,4%) verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus -399C>T die Menge des TFPI-1-Antigens im Plasma nicht ändert. Die Prävalenz des Polymorphismus von gesunden Japanern und Patienten mit venöser Thrombose war vergleichbar (Miyata *et al.*, 1998).

Des Weiteren wurde, wie bereits für die Apoplex-Patienten beschrieben, die FVII(R353Q)-Mutation bestimmt. In unserer Studie waren 21% der Patienten heterozygot für RQ, 78% homozygot für R und 1% homozygot für Q. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine 10 bp große Insertion, auch A2-Allel genannt, an Position -323 des FVII-Gen-Promotors das Risiko für einen Myokardinfarkt reduziert. Es waren 18% Patienten heterozygot für I/D, 80% homozygot für D und 2% homozygot für I. In einer italienischen Studie wurde die Genotyp-Verteilung von 175 Patienten nach Myokardinfarkt (RR 75,4%; RQ 22,9%; QQ 1,7% und D/D 75,4%; D/I 21,7%; I/I 2,9%) mit 110 Patienten ohne (RR 59,1%; RQ 37,3%; QQ 3,6% und D/D 58,2%; D/I 35,5%; I/I 6,4%) verglichen (Girelli *et al.*, 2000). Es wurden mehr heterozygote und homozygote für das Q- und das A2-Allel (Insertion) in Patienten mit koronarer Herzerkrankung ohne Myokardinfarkt detektiert, als in Patienten mit. Der Unterschied war signifikant. Möglicherweise haben bestimmte Faktor VII-Genotypen eine schützende Funktion vor Myokardinfarkt (Girelli *et al.*, 2000).

### 3.4.3. Etablierung der DHPLC-Analysebedingungen

Für die Untersuchung der einzelnen Exons der TFPI-Gene wurden Primer-Paare ausgewählt, die mit Bereichen in den flankierenden Introns hybridisieren (Abb. 3-15). Die optimalen *Annealing*-Temperaturen der Primer-Paare wurden für jedes DNA-Fragment experimentell ermittelt.



**Abb. 3-15:** Schematische Darstellung der TFPI-Gene mit markierten DHPLC-Primern für die Amplifizierung der einzelnen Exons (nicht maßstabsgetreu). A: TFPI-1-Gen, B: TFPI-2-Gen.

Für jedes DNA-Fragment wurde ein geeigneter Acetonitril-Gradient und die optimale Analysetemperatur mit Hilfe des *Wavemaker* 4.1.42 Programms ermittelt, um die erfolgreiche Trennung von Homo- und Heteroduplices zu gewährleisten. Des Weiteren wurde für die Analyse eine Temperatur ausgewählt, bei der ca. 50-80% des DNA-Fragments als  $\alpha$ -Helix vorliegen.

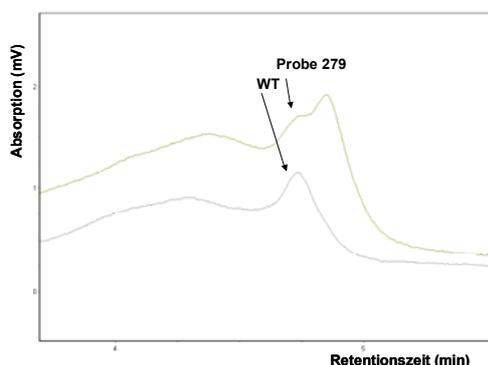
DNA-Fragmente mit mehr als einer Schmelzdomäne wurden bei mindestens zwei verschiedenen Temperaturen analysiert. Der Acetonitril-Gradient wurde so gewählt, dass die DNA-Probe nach einer Retentionszeit von 3-5 Minuten von der Säule eluiert wird. Die Primersequenzen und die DHPLC-Analysebedingungen für die einzelnen Exons der TFPI-Gene sind in Abschnitt 6.8. aufgeführt.

### 3.4.4. Untersuchung des TFPI-1-Gens mittels DHPLC in Apoplex-Patienten

Das TFPI-1-Gen wurde mit der DHPLC-Methode analysiert. Die Chromatogramme der Exons 1-8 des TFPI-1-Gens entsprachen alle dem Wildtyp (Tab. 3-7). In Exon 9 wurde für drei Patienten ein Elutionsprofil detektiert, das sich vom WT unterscheidet (Abb. 3-16). Die Proben wurden erneut aus genomischer DNA amplifiziert und sequenziert. Es wurde ein bereits bekannter Polymorphismus 1006G>A identifiziert, der einen Aminosäureaustausch an Position 264 von Valin zu Methionin kodiert (Moatti *et al.* 1999). Die Häufigkeit des heterozygoten Polymorphismus im Kollektiv lag bei 7,3% (3/41).

TFPI-1-Gen	Sequenzvariation	Patient Nr.	Häufigkeit
TFPI-1_Ex1	-	-	-
TFPI-1_Ex2	-	-	-
TFPI-1_Ex4	-	-	-
TFPI-1_Ex5	-	-	-
TFPI-1_Ex6	-	-	-
TFPI-1_Ex7	-	-	-
TFPI-1_Ex8	-	-	-
TFPI-1_Ex9	1006G>A bekannt V264M	142, 195, 279	3/41 7,3%

**Tab. 3-7:** DHPLC-Analyse des TFPI-1-Gens der juvenilen Apoplex-Patienten (n=41). Es wurde keine (-) Sequenzvariation in den Exons 1-8 detektiert. In Exon 9 wurde bei 3 Patienten der Polymorphismus 1006G>A, der einen Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin kodiert, identifiziert.



**Abb.3-16:** DHPLC-Analyse: Die Apoplex-Patienten-Probe 279 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil in Exon 9 des TFPI-1-Gens (Analysetemperatur 51,6°C).

### 3.4.5. Untersuchung des TFPI-2-Gens mittels DHPLC in Apoplex-Patienten und Patienten nach *Stent*-Implantation

Für die Apoplex-Patienten wurden keine Sequenzvariationen in den kodierenden Exons identifiziert, aber in den flankierenden Introns und in der nicht-translatierten Region (Tab. 3-8). Es wurden drei Sequenzvariationen IVS2 -82A>G, IVS2 +49A>G und IVS2 +59A>G in den flankierenden Intronregionen des Exons 2 der Apoplex-Patienten-Probe 327 identifiziert. Die Sequenzvariation IVS4 +113C>T wurde bei den Apoplex-Patienten 180, 229 und 279 und der als WT verwendeten Probe detektiert. In der nicht-translatierten Region wurde die bereits bekannte Sequenzvariation c.922A>G mit einer Häufigkeit von 12,2% nachgewiesen.

Die zuvor beschriebenen Patienten nach einer *Stent*-Implantation wurde ebenfalls auf Sequenzvariationen im TFPI-2-Gen untersucht. In Exon 3 wurde für 6 Patienten ein Elutionsprofil detektiert, dass sich vom WT unterscheidet. Die 6 Patienten-Proben wurden neu amplifiziert und sequenziert. Es wurde ein neuer Polymorphismus c.396G>A im Exon nachgewiesen, der aber keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz (pE107E) hat. In den flankierenden Intron-Regionen von Exon 1, 2 und 5 wurden verschiedenen Sequenzvariationen detektiert, die aber nicht in den relevanten Regionen, die für das Spleißen verantwortlich sind, vorkommen (Tab. 3-8).

TFPI-2-Gen	Sequenzvariation	Apoplex-Patienten		Patienten nach <i>Stent</i> -Implantation	
		Patient Nr.	Häufigkeit	Patient Nr.	Häufigkeit
TFPI-2_ Ex1	IVS +48G>T	-	-	51	1/108 0,9%
TFPI-2_ Ex2	IVS2 -82A>G IVS2 +49A>G IVS2 +59A>G	327	1/41 2,4%	6, 12,25, 27, 28, 53	6/108 5,6%
TFPI-2_ Ex3	c.396G>A p.E107E neutral	-	-	6, 12, 25, 27, 28, 53	6/108 5,6%
TFPI-2_ Ex4	IVS4 +113C>T	WT, 180, 229, 279	3/41 7,3%	-	-
TFPI-2_ Ex5	c.922A>G bekannt	78, 131, 239, 328, 330	5/41 12%	Wt, 58 Patienten	58/108 53,7%

**Tab. 3-8:** Ergebnisse der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Gens. Für die Apoplex-Patienten wurden keine Sequenzvariation (-) in den kodierenden Exons identifiziert. In den flankierenden Intronregionen der Exons 2 und 4 wurden die Sequenzvariationen IVS2 -82A>G, IVS2 +49A>G, IVS2 +59A>G und IVS4 +113C>T identifiziert. In der nicht-translatierten Region wurde die Sequenzvariation c.922A>G detektiert. Für die Patienten nach einer *Stent*-Implantation wurde eine neue Sequenzvariation in Exon 3 detektiert, die einen neutralen Aminosäureaustausch bewirkt. In den flankierenden Intronregionen der Exons 1 und 2 wurden die Sequenzvariationen IVS1 +48G>T, IVS2 -82A>G, IVS2 +49A>G, IVS2 +59A>G und in der nicht-translatierten Region die Sequenzvariation c.922A>G identifiziert.

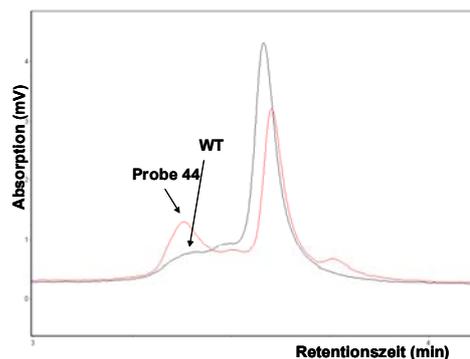
### 3.5. Analyse der Promotorregion des humanen TFPI-2-Gens

#### 3.5.1. Nachweis von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens in Apoplex-Patienten und Blutspendern

Für die DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotors wurde ein 729 bp großes Fragment stromaufwärts vom Translationsstart des TFPI-2-Gens ausgewählt. Das Fragment wurde in drei überlappende Fragmente unterteilt und die PCR-Produkte aus genomischer DNA amplifiziert. Die Primersequenzen und die DHPLC-Analysebedingungen sind in Tab. 6-15 aufgeführt. Es wurden die bereits zuvor beschriebenen juvenilen Apoplex-Patienten und 140 Blutspender (Durchschnittsalter 38 Jahre, S.D. 11,7; 95 Männer, 45 Frauen) analysiert. Genomische DNA wurde sequenziert, wenn die Analyse der Proben ein Elutionsprofil zeigte, das sich vom Wildtyp unterscheidet.

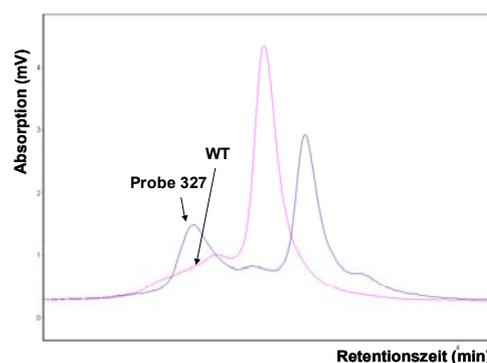
Für die Apoplex-Patienten wurden 6 verschiedene Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -47C>A und -18C>A in der Promotorregion des TFPI-2-Gens identifiziert (Abb. 3-17 bis Abb. 3-22).

**Sequenzvariation : -567C>T**

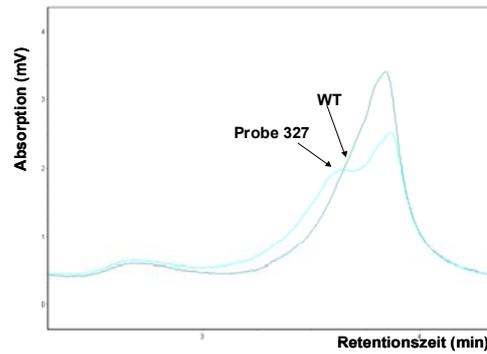


**Abb. 3-17:** Die Apoplex-Patienten-Probe 44 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 56,6°C).

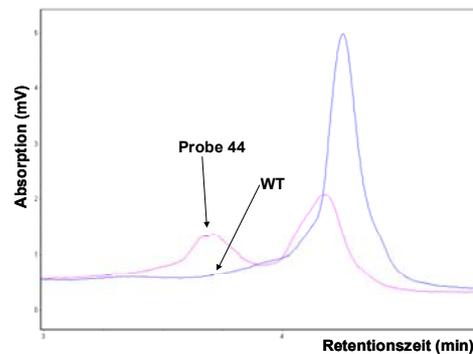
**Sequenzvariation: -546T>C**



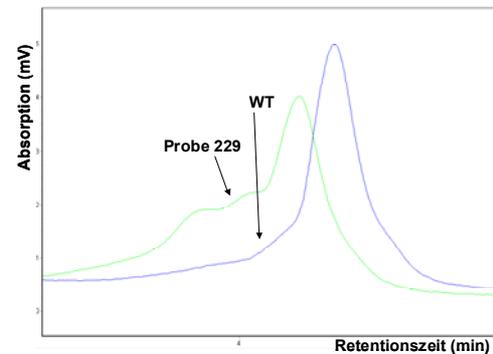
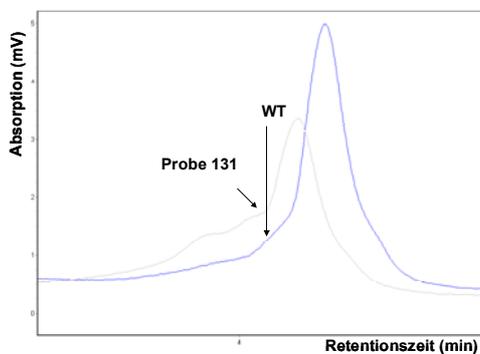
**Abb. 3-18:** Die Apoplex-Patienten-Probe 327 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 56,6°C).

**Sequenzvariation: -353A>G**

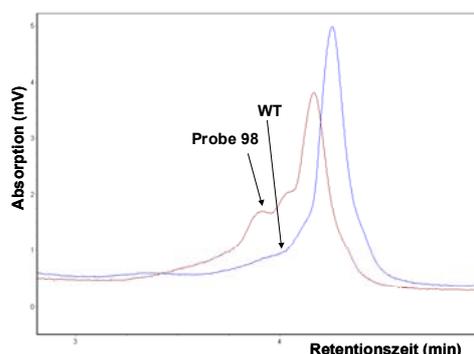
**Abb. 3-19:** Die Apoplex-Patienten-Probe 327 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 60,0°C).

**Sequenzvariation: -167G>A**

**Abb. 3-20:** Die Apoplex-Patienten-Probe zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 68,2°C).

**Sequenzvariation: -47C>A**

**Abb. 3-21:** Die Apoplex-Patienten-Proben 131 und 229 zeigen ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 68,2°C).

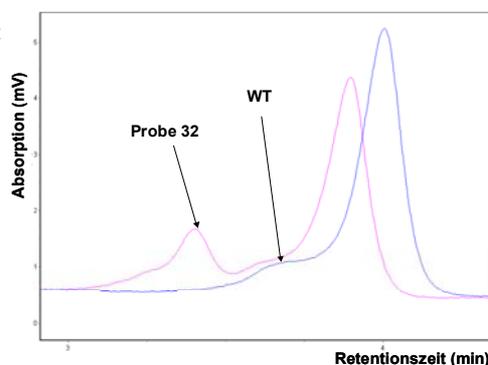
**Sequenzvariation: -18C>A**

**Abb. 3-22:** Die Apoplex-Patienten-Probe 98 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 68,2°C).

Mit der DHPLC-Methode wurden 140 gesunde Blutspender analysiert. Es wurden 5 Sequenzvariationen detektiert, davon wurden 4 (-47C>A, -167G>A, -353A>G und -546T>C) bereits bei den Apoplex-Patienten identifiziert (Tab. 3-9). Zusätzlich wurde eine neue Sequenzvariation -161G>C detektiert (Abb. 3-23). Zwei Sequenzvariationen -567C>T und -18C>A kamen nur bei den Apoplex-Patienten vor.

Sequenzvariation	Apoplexpatienten Nr.	Blutspender Nr.
-567T>C	44	-
-546T>C	327	2, 6624
-353A>G	327	2, 6624
-167G>A	44	6580, 6624
-161G>C	-	32
-47C>A	131, 229	19, 6165, 5989
-18C>A	98	-

**Tab. 3-9:** DHPLC-Analyse: Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens bei Apoplex-Patienten und Blutspendern.

**Sequenzvariation: -161G>C**

**Abb. 3-23:** Die Blutspender-Probe 32 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 68,2°C).

Die allelische Häufigkeit der Sequenzvariationen von Apoplex-Patienten und Blutspendern und die berechneten  $p$ -Werte sind in Tabelle Abb. 3-10 zusammengefasst. Alle Patienten und Blutspender waren heterozygot für die beschriebenen Sequenzvariationen, nur ein Blutspender war homozygot für die Sequenzvariation -47/A. Die  $p$ -Werte lagen zwischen 0,23 und 1,00.

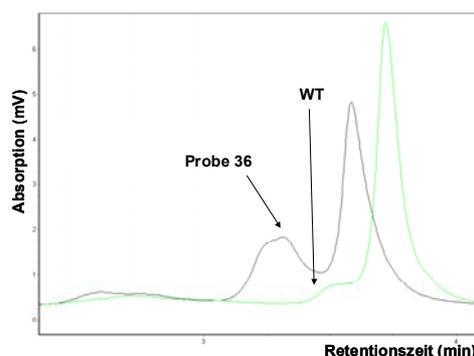
SNP	Apoplex-Patienten n = 41	Blutspender n = 140	$p$ -Wert Apoplex-Patienten vs. Blutspender
-567T>C	1/82	0/280	0,23
-546T>C	1/82	2/280	0,54
-353A>G	1/82	2/280	0,54
-167G>A	1/82	2/280	0,54
-161G>C	0/82	1/280	1,00
-47 C>A	2/82	4/280	0,62
-18C>A	1/82	0/280	0,23

**Tab. 3-10:** Die allelische Häufigkeit der Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens bei Apoplex-Patienten und Blutspendern ( $p > 0,05$ ).

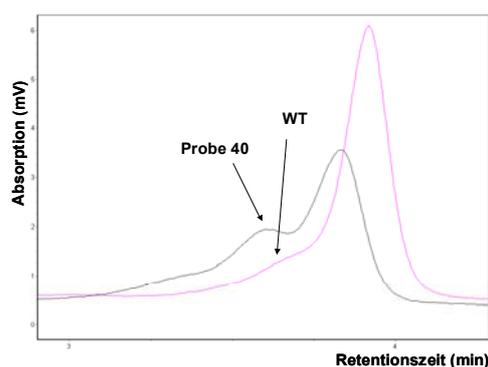
### 3.5.2. Nachweis von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens in Patienten nach *Stent*-Implantation

Es wurden 108 Patienten nach einer *Stent*-Implantation auf Sequenzvariationen in der TFPI-2-Promotorregion untersucht. Es wurden 2 neue Sequenzvariationen -587G>T und -98C>T identifiziert (Abb. 3-24 und Abb. 3-25).

#### Sequenzvariation: -587G>T



**Abb. 3-25:** Die Patienten-Probe 36 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysetemperatur 56,6°C).

**Sequenzvariation: -98C>T**

**Abb. 3-24:** Die Patienten-Probe 40 zeigt ein vom Wildtyp verschiedenes Elutionsprofil bei der DHPLC-Analyse des TFPI-2-Promotorfragments (Analysentemperatur 68,2°C).

Die Ergebnisse der DHPLC-Analyse von Patienten nach einer *Stent*-Implantation sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst. Die Sequenzvariationen -546T>C und -353A>G wurden jeweils bei 6 Patienten identifiziert. Die beiden Variationen treten, wie bei der Apoplex-Patienten-Probe 327 und bei den Blutspender-Proben 2 und 6624, gekoppelt auf.

Sequenzvariation	Patienten Nr.
-587G>T	36
-567T>C	86
-546T>C	6, 12, 25, 27, 28, 53
-353A>G	6, 12, 25, 27, 28, 53
-167G>A	86
-161G>C	-
-98C>T	40
-47C>A	9, 70
-18C>A	42

**Tab. 3-11:** DHPLC-Analyse: Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens bei Patienten nach einer *Stent*-Implantation.

Die allelische Häufigkeit der Sequenzvariationen bei Patienten nach einer *Stent*-Implantation im Vergleich zu Blutspendern ist in Tabelle 3-12 angegeben. Alle Patienten waren heterozygot für die detektierten Sequenzvariationen. Die berechneten *p*-Werte lagen zwischen 0,08 und 1,00.



### 3.5.4. Klonierung und Mutagenese des WT-TFPI-2-Promotorfragments

In der Promotorregion des TFPI-2-Gens wurden verschiedene Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A mittels DHPLC identifiziert. Um den Einfluss dieser Sequenzvariationen auf die Promotoraktivität des Gens zu untersuchen, sollte das WT-TFPI-2-Promotorfragment in einen Vektor ohne eigenen eukaryotischen Promotor und *Enhancer* kloniert werden. Der SEAP-Reporter-gen-Vektor pSEAP2-*Basic* ist hierfür geeignet.

#### Strategie zur Klonierung des WT-TFPI-2-Promotorfragments (Abb. 3-27)

1. Amplifizierung des WT-TFPI-2PF aus genomischer WT-DNA und Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor.
2. Amplifizierung des WT-TFPI-2PF ohne Translationsstart (ATG) in den pSEAP2-*Basic* Vektor.
3. Herstellung der 7 verschiedenen Promotormutanten: Einführung der Sequenzvariationen mit *site-directed* Mutagenese.

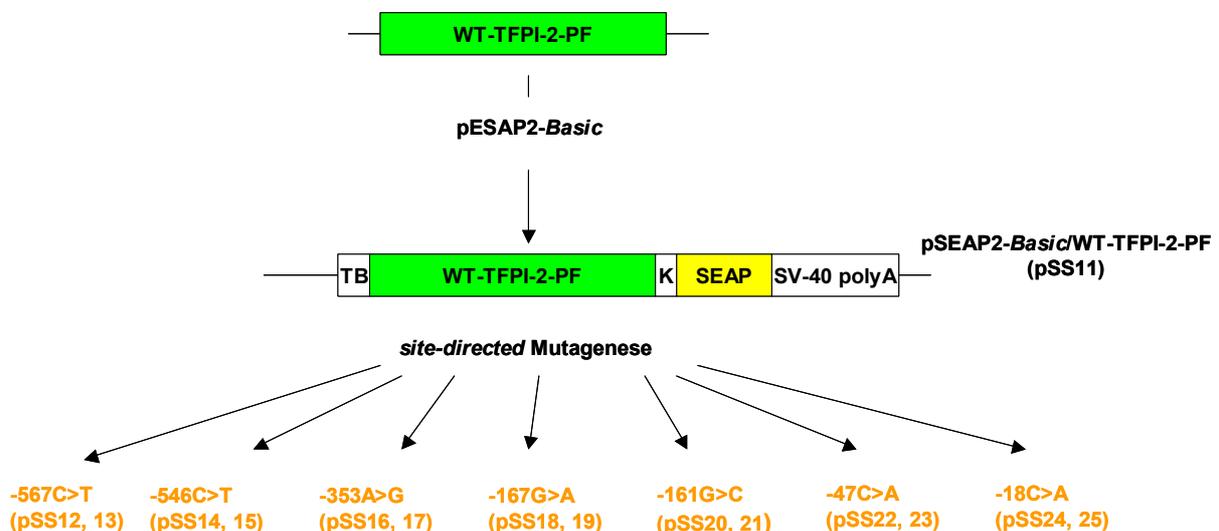


Abb.3-27: Strategie zur Klonierung und Mutagenese des TFPI-2-Promotorfragments. Dargestellt ist das pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-Promotor-Konstrukt und die Einführung der 7 verschiedenen Sequenzvariationen (-567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A, -18C>A) mittels *site-directed* Mutagenese. TB: Transkriptionsblocker, K: Kozak-Sequenz für das Translationsinitiationssignal, SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-kodierende Sequenz, SV-40 polyA-Sequenz.

### 3.5.4.1. Klonierung in den Vektor pSEAP2-Basic

Das TFPI-2-Promotorfragment mit einer Größe von 729 bp stromaufwärts vom Translationsstart des TFPI-2-Gens wurde aus genomischer WT-DNA mit den Primern TFPI-2P4032U und TFPI-2P4787L amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (Abb. 3-28). *E.coli TOP 10*-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. In einer Kolonie-PCR mit den Primern M13Reverse und TFPI-2P2SeqL wurden die Klone auf die Insertion des WT-TFPI-2-Promotorfragments untersucht. Aus Klonen, die ein Fragment mit der richtigen Größe aufgenommen haben, wurde Plasmid-DNA isoliert, sequenziert und mit der bereits veröffentlichten Sequenz unter der *Acession No. AY044097*, *NCBI* verglichen. Das Plasmid pCR2.1-TOPO/WT-TFPI-2-PF enthält das WT-TFPI-2-Promoterfragment mit der homologen Sequenz und wurde pSS9 genannt.

```

1  GCTAGTCTCG AACTCCTGAT TTCAGGTGAT CCACCCGCCT TGGCCTCCCA
51  AAGTGCTGGG ATTACAGGCG CGAGCTACCG CGCCCAGCCA AAATGTTCTA
101 ATCTTTTATT GGTGGCTACA CAGTTGTCAA AATTTATCAA ACTGTCCACC
151 TACGATATAT TATAAGCCTG TATTAAATGT AAATTAGAAC TCGATTGAAA
201 TCTGTGTGTA TAAATATAAA TATACACTTA TTTACATTTT TAATCTAATC
251 TGAAGGTCCA TTGCAACGAA TCCCGCTCCG CTCTGACCCA AGAACTCCGC
301 ACTTTCTCTC CACCAGCCTT TCAAAATACCT GAACTTCATG CCTTCAAGAG
351 GTGGATTCCG GCTTCTTTAC AGCGCAATCA CTAGCAGGTC ATTTCCGTCT
401 AGCTTGCAGA TTTCCCATTA CTGACACAAA CGCTCCCTCA GGGCGTCCCC
451 GTCTGGACTA CAGGAGAAA GTTGGGAGGC AGGTCAACT TTTCAACTTG
501 GCGGGGAATT CCTCTCCCTC TTACACAGTT TGCAGCGCGG GGGCGGCGGG
551 GTGACAGTCC CCGTGCATGA ATCAGCCACC CCTCAGGCTC CGCCCCGGCG
601 GGGGTCGGCC GGACGCTCGC CCCGCATAAA GCGGGCACCC GGGCCGCTTG
651 GAGCAGAAA GCGCGCACCT CCTCCCGCCA GCGCGTTTCT CGGACGCCTT
701 GCCCAGCGGG CCGCCCGACC CCCTGCACCA TGGACCCCGC TCGCCCCCTG
751 GGGCTGTCGA TTCTGCTGCT TTT

```

**Abb. 3-28:** Nukleotidsequenz des WT-TFPI-2-Promotorfragments. Die Primersequenzen sind unterstrichen und der Translationsstart (ATG) ist umrandet.

Die Plasmid-DNA (pSS9) wurde in ein PCR mit spezifischen Primern, die Schnittstellen für *XhoI* und *NruI* enthalten eingesetzt und erneut in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert (pSS10). Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *NruI* und *XhoI* gespalten und mit einem Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmid-DNA des Vektors pSEAP2-Basic wurde parallel dazu mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten und im Gel aufgetrennt. Das geschnittene WT-TFPI-2-Promotorfragment und der linearisierte Vektor pSEAP2-Basic wurden aus dem Gel eluiert und in eine Ligation eingesetzt. *E.coli TOP 10*-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurden Klone, die ein Fragment mit der richtigen Größe aufgenommen haben, ermittelt.

Die korrekte Insertion des WT-TFPI-2-PF in den pSEAP2-*Basic*-Vektor wurde nach Doppelstrangsequenzierung bestätigt und das Plasmid wurde pSS11 genannt.

#### 3.5.4.2. Mutagenese des WT-TFPI-2-Promotorfragments

Der Vektor pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-PF (pSS11) diente als Ausgangsplasmid für die *site-directed* Mutagenese. Die sieben Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A wurden mit spezifischen Mutagenese-Primerpaaren, die jeweils einen Nukleotidaustausch enthalten, eingeführt. Es wurde Plasmid-DNA von jeweils 2 Klonen einer Sequenzvariation isoliert und die erfolgreiche Mutagenese mittels Sequenzierung bestätigt.

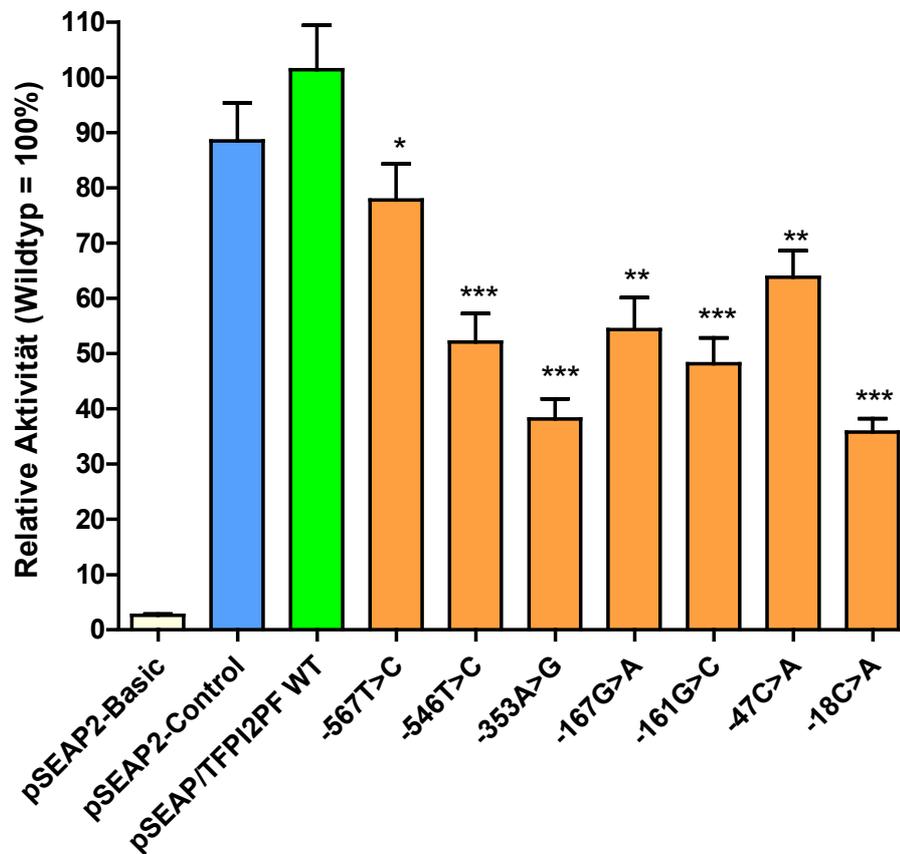
#### 3.5.5. Untersuchung von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens auf die transkriptionelle Aktivität

Um den Einfluss der Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A auf die Promotoraktivität des TFPI-2-Gens zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen mit dem Plasmid pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-PF transfiziert. Parallel dazu wurden Plasmide transfiziert, die jeweils einen Nukleotidaustausch in der cDNA des WT-TFPI-2-PF enthalten.

Als Negativkontrolle wurde der pSEAP2-*Basic*-Vektor ohne *Insert* verwendet. Der pSEAP2-*Control*-Vektor, der unter der transkriptionellen Regulation eines *SV-40 early* Promotors und eines *SV-40 Enhancers* steht, diente als Positivkontrolle für den Promotoraktivitätstest.

Die Zellkulturüberstände wurden auf SEAP-Aktivität untersucht. Der Zellkulturüberstand von HEK-293-Zellen, die mit dem Plasmid pSEAP2-*Basic*/WT-TFPI-2-PF transfiziert wurden, zeigte die höchste SEAP-Aktivität.

Die SEAP-Aktivität der Kontrollen und der Promotormutanten wurden als relativer Anteil des Wildtyps dargestellt (Abb. 3-29). Die Promotoraktivität der getesteten Mutanten war 1,3-2,8-fach reduziert im Vergleich mit dem Wildtyp ( $p < 0,05$ ). Die Mutanten -546C>T und -18C>A, welche in möglichen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp-1 lokalisiert sind, zeigten eine verminderte SEAP-Aktivität von 52% und 36%.



**Abb. 3-29:** Promotoraktivitätstest: Analyse von Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens.

HEK-293-Zellen wurden mit SEAP-cDNA, die das WT-TFPI-2-Promotorfragment enthält und mit Mutanten, die einen Nukleotidaustausch enthalten, transfiziert. Der pSEAP2-Basic-Vektor ohne *Insert* wurde als Negativkontrolle und der pSEAP2-Control-Vektor als Positivkontrolle verwendet.

Die SEAP-Aktivität wurde in Zellkulturüberständen mit CSPD-Substrat bestimmt. Es wurden drei unabhängige Experimente, die jeweils in Dreifachbestimmung gemessen wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  S.D. relativ zum Wildtyp dargestellt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Für das WT-TFPI-2-Promotorfragment wurde die höchste SEAP-Aktivität gemessen. Alle Promotormutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte SEAP-Aktivität von 78% auf 36%.

## 4 Diskussion

Das hämostatische System, setzt sich aus den Komponenten Blutgerinnung, Gerinnungshemmung und Gerinnseauflösung (Fibrinolyse) zusammen und steht unter physiologischen Bedingungen in einem dynamischen Gleichgewicht. Unter pathologischen Bedingungen kann es zu einem Ungleichgewicht kommen. Aus einem Mangel von gerinnungsfördernden oder fibrinolysehemmenden Faktoren resultiert eine spontane oder verletzungsbedingte Blutungsneigung, während im umgekehrten Fall die Neigung sowohl zu venösen und arteriellen Thrombosen, als auch Thromboembolien zunimmt.

Der exogene plasmatische Gerinnungsweg wird von TFPI-1, durch Bildung eines quarternären Komplexes mit Faktor Xa und TF/Faktor VIIa, gehemmt. TFPI-2 ist ein weiterer Serinproteinase-Inhibitor, dessen physiologische Bedeutung noch nicht geklärt ist. Beide besitzen eine saure aminoternale Region, drei tandemartig angeordnete *Kunitz*-Typ-Domänen und ein basisches carboxyterminales Ende. TFPI-2 weist eine große Homologie zur Primärsequenz des TFPI-1 auf, dies deutet darauf hin, dass die beiden Gene infolge einer Genduplikation entstanden sind (Sprecher *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2001).

TFPI-2 beeinflusst möglicherweise die Hämostase während der Schwangerschaft, da während dieser Zeit die TFPI-2-Konzentration im Plasma 40 bis 70-fach erhöht ist. Eine Beteiligung an arteriosklerotischen und inflammatorischen Prozessen wird vermutet (Herman *et al.*, 2001; Peerschke *et al.*, 2004; Iino, *et al.*, 1998). Des Weiteren wird für das TFPI-2-Gen eine Tumorsuppressorgen-Funktion diskutiert (Hube *et al.*, 2003; Konduri *et al.*, 2003).

### **4.1. Untersuchungen der rekombinant exprimierten TFPI-1,-2 und der [P151L]TFPI-1-Mutante**

Um TFPI-1 und -2 und die [P151L]TFPI-1-Mutante miteinander vergleichen zu können, wurden diese kloniert und in zwei verschiedenen Expressionssystemen rekombinant dargestellt. Hierfür wurde ein COS-1-Säugerzellsystem und ein *High Five*-Insektenzellsystem ausgewählt. Für rWT-TFPI-1 und die r[P151L]TFPI-1-Mutante konnte quantitativ die Konzentration und Aktivität bestimmt werden. Im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen konnte für rWT-TFPI-1 eine Konzentration von 437 ng/ml und für r[P151L]TFPI-1-Mutante 427 ng/ml gemessen werden. In *High Five*-Insektenzellen konnte für rWT-TFPI-1 eine Konzentration von 4,82 ng/ml und für r[P151L]TFPI-1-Mutante eine Konzentration von 6,41 ng/ml nachgewiesen werden. Die physiologische Konzentration von TFPI-1 im Plasma liegt zwischen 54-124 ng/ml (Novotny *et al.*, 1991). Die Zellen wurden bisher transient transfiziert, nach Etablierung stabiler Klone mit Hygromycin bzw. Blastidicin sollte eine deutlich höhere TFPI-Konzentration erreichbar sein.

In einer Studie wurde gezeigt, dass stabil transfizierte BHK (*Baby hamster kidney*)-Zellen 1-2 µg/ml des rTFPI-1 exprimieren, welches über Heparin-Sepharose Chromatografie, Ionenaustausch-Chromatografie und *reversed phase* HPLC aufgereinigt wurde. Aufgereinigter rTFPI-1 zeigte eine spezifische Aktivität von 30,000 U/mg und besitzt ein Molekulargewicht von 42 kDa (Pedersen *et al.*, 1990).

Die Bestimmung der TFPI-Aktivität hat gezeigt, dass rWT-TFPI-1 und die r[P151L]TFPI-1-Mutante eine deutlich geringere Aktivität aufweist als das native TFPI, welches eine Aktivität von 0,018 U/ng im Blutplasma besitzt. Die relative Aktivität lag für rWT-TFPI-1 bei 83% und für r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 89% im Zellkulturüberstand von COS-1-Zellen. In *High Five*-Insektenzellen lag die relative Aktivität für rWT-TFPI-1 bei 61% und für r[P151L]TFPI-1-Mutante bei 89%. Die r[P151L]TFPI-1-Mutante zeigte in beiden Expressionssystemen eine höhere Aktivität als der rWT-TFPI-1. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Der Grund für die geringere Aktivität der rekombinanten Proteine könnte an den verwendeten Expressionssystemen liegen. Möglicherweise weisen die rekombinanten Proteine eine andere Faltungsstruktur oder ein vom nativen Protein differierendes Glykosylierungsmuster auf, was zu einer geringeren Aktivität führt. Ein weiterer möglicher Grund könnte die aktive Sekretion sein, die mit Strukturveränderungen des Proteins verbunden sein kann. Die rekombinanten Proteine besitzen ein Sekretionssignal und ein *Tag*, welche möglicherweise einen Einfluß auf die Struktur und Aktivität des Proteins haben können.

TFPI-2 wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und zu ~60-90% in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Iino *et al.*, 1988). Die TFPI-2-Konzentration in Humanplasma liegt zwischen 0,43 und 0,49 ng/ml (Bützow *et al.*, 1988). Eine stabil transfizierte humane Fibrosarkom (HT-1080)-Zelllinie produziert 55 ng TFPI-2 pro ml (Chand *et al.*, 2003).

Mittels *Western blot* konnte rWT-TFPI-2 in Zellkulturüberständen von COS-1-Säugerzellen und *High Five*-Insektenzellen nachgewiesen werden. Eine Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung wie für TFPI-1 konnte nicht durchgeführt werden, da hierfür kein Testsystem verfügbar war. Die inhibitorische Aktivität des rWT-TFPI-2 im Zellkulturüberstand von COS-1- und *High Five*-Zellen konnte mit einer verminderten Chymotrypsin-Aktivität von 31% und 62% gezeigt werden. Des Weiteren konnte eine antikoagulatorische Aktivität für rWT-TFPI-2 nachgewiesen werden. Hierfür wurde eine modifizierte verdünnte Thromboplastinzeit von COS-1- und *High Five*-Zellkulturüberständen, mit und ohne rWT-TFPI-2, gemessen. rWT-TFPI-2, exprimiert in COS-1-Zellen, zeigte eine minimale, aber nicht signifikante antikoagulatorische Aktivität, während für rWT-TFPI-2 exprimiert in *High Five*-Zellen eine deutlich erkennbare antikoagulatorische Aktivität nachgewiesen wurde ( $p < 0,01$ ).

Eine geringe antikoagulatorische Aktivität für TFPI-1, auch als TFPI-1-Resistenz definiert, konnte in 4,7% der Kontrollen und 11% der Patienten mit venöser Thrombose gezeigt werden (Tardy-Poncet, *et al.*, 2003).

Diese TFPI-1-Resistenz wurde mit einem 3-fach erhöhten Risiko für Thrombose assoziiert und ist daher ein neuer hämostatischer Risikofaktor für venöse Thrombose.

Sowohl mit einem chromogenen Substrattest für Chymotrypsin, als auch mit Hilfe einer modifizierten PTT konnte eine Aktivität für rWT-TFPI-2 nachgewiesen werden. In *High Five*-Insektenzellen exprimierte Proteine zeigten eine höhere Aktivität im Vergleich zu COS-1-Säugerzellen, vermutlich beeinflussen die verwendeten Expressionssysteme, wie bereits für TFPI-1 beschrieben, die Aktivität.

#### **4.2. Untersuchung der TFPI-Gene auf genetische Variationen**

Polymorphismen und Mutationen in Genen, die mit dem hämostatischen System verwandt sind, werden mit arteriellen vaskulären Erkrankungen assoziiert (Voetsch & Loscalzo, 2004). Für das TFPI-1-Gen und seinen Promoter sind bereits einige Polymorphismen bekannt. Zwei Polymorphismen kodieren einen Aminosäureaustausch, der Nukleotidaustausch 536C>T in Exon 7 und der Nukleotidaustausch 1006G>A in Exon 9 (Kleesiek *et al.*, 1998; Moatti *et al.*, 1999).

Für die Analyse der TFPI-Gene auf krankheitsassoziierte genetische Variationen wurden 41 juvenile Apoplex-Patienten ausgewählt, die alle keine Risikofaktoren für eine venöse Thrombose aufwiesen.

Die Untersuchung des TFPI-1-Gens mit der DHPLC-Methode ergab für die Exons 1-8 keinen neuen Polymorphismus. Für Exon 9 wurde der bereits bekannte Polymorphismus 1006G>A mit einer Häufigkeit von 7,3% detektiert. In vorangegangenen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und venösen thromboembolischen Erkrankungen oder Restenose nach koronarer Angioplastie erbracht werden (Arnaud *et al.*, 1999; Moatti *et al.*, 2001).

Für das TFPI-2-Gen wurden keine krankheitsassoziierten Polymorphismen beschrieben. Alle 5 Exons des TFPI-2-Gens wurden mittels DHPLC untersucht. Für die 41 Apoplex-Patienten wurden keine neuen Sequenzvariationen, die eine Aminosäureaustausch kodieren, detektiert. In den flankierenden Intronabschnitten wurden Sequenzvariationen identifiziert, die aber nicht in relevanten Regionen, die für das Spleißen verantwortlich sind, vorkommen.

Das TFPI-2-Gen wurde ebenfalls mittels DHPLC in 108 Patienten nach *Stent*-Implantation untersucht. Für die Patienten konnte nach molekulargenetischer Untersuchung kein erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankung, Restenose oder Myokardinfarkt festgestellt werden. Es wurden keine neuen Sequenzvariationen, die einen Aminosäureaustausch kodieren, identifiziert. Die Intronvariationen IVS2 -82A>G, IVS2 +49A>G und IVS2 +59A>G treten gekoppelt mit der Sequenzvariation c.396G>A in Exon 3 auf, die einen neutralen Aminosäureaustausch (p.E107E) kodiert. Es zeigten 5,6% der Patienten nach *Stent*-Implantation diese Konstellation.

Die Tatsache, dass bisher nur sehr wenige krankheitsassoziierte Polymorphismen für TFPI-1 und keine für TFPI-2 bekannt sind, resultiert möglicherweise daraus, dass die beiden Gene infolge einer Genduplikation (Sprecher *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 2001) entstanden sind und eine hoch-konservierte *Kunitz*-Typ-Domänen-Struktur aufweisen.

### **4.3 Analyse der Sequenzvariationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens**

Die Promotorregion des humanen TFPI-2-Gens ist sehr GC-reich und enthält keine CAAT- und keine TATA-Box im Gegensatz zum murinen Gen. Anstelle eines einheitlichen Startpunktes sind mehrere eng beieinander liegende Transkriptionsinitiationsstellen in der Promotorregion enthalten (Kamei *et al.*, 2001; Hube *et al.*, 2003). Der minimale Promotor ist zwischen -166 und -111 vom Startkodon lokalisiert. Alle diese Faktoren deuten auf einen typischen Haushaltsgen-Promotor hin.

Die Promotorregion bietet einigen Transkriptionsfaktoren MyoD, Lyf-1, NF-Y, GATA, Oct-1, AP-1, SP-1, NF1, NF- $\kappa$ B und erg-1 potentielle Bindungsstellen. Die Transkriptionsfaktoren NF1, NF- $\kappa$ B und erg-1/SP-1 scheinen essentiell für die TFPI-2-Expression zu sein (Hube *et al.*, 2003).

Eine CpG-Insel von ~220 bp, umspannt Exon 1 und die drei Transkriptionsinitiationsstellen (Hube *et al.*, 2003). CpG-Inseln können methyliert oder unmethyliert vorliegen und beeinflussen die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Es wird vermutet, dass der TFPI-2-Gen-Promotor über DNA-Methylierung reguliert wird und TFPI-2 möglicherweise ein Kandidat für ein Tumorsuppressorgen ist (Konduri *et al.*, 2003; Hube *et al.*, 2003). In normalen Zellen werden CpG-Inseln vor Methylierung geschützt, über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus. Werden CpG-Inseln in der Promotorregion von Tumorsuppressorgen hypermethyliert, dann kommt es zum *gene silencing* und zur Tumorprogression.

Eine pharmakologische Reaktivierung des TFPI-2-Gens in fortgeschrittenen Tumoren ist möglicherweise eine geeignete therapeutische Strategie (Konduri *et al.*, 2003).

Die Methylierung der DNA scheint essentiell zu sein für eine normale Entwicklung, die Inaktivierung des X-Chromosoms, genetische Prägung (*Imprinting*) und für die Unterdrückung von parasitären DNA-Sequenzen (Robertson und Jones, 2000). Auf der anderen Seite können CpG-Inseln *hot spots* für erworbene somatische Mutationen sein, die zur Tumorentstehung führen (Rideout *et al.*, 1990). 5-Methylcytosin kann durch hydrolytische Desaminierung in Thymin überführt werden, eine C→T Transition, die vom Reparatursystem nicht erkannt wird. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Methylierung der DNA die Promotoraktivität beeinflusst und die Genaktivität unterdrückt.

Zwei Mechanismen sind für die Repression verantwortlich. Zum einen wird die Sequenzspezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren, die CpG-Stellen in ihren Bindungstellen enthalten, gehemmt wie zum Beispiel von c-Myc und E2F, die an *cAMP-responsive elements* binden (Tate und Bird, 1993). Zum anderen gibt es mehrere DNA-bindende-Proteine, die bevorzugt an DNA mit 5'-Methylcytosin binden wie zum Beispiel die Methyl-CpG-Bindeproteine (MeCP). Diese Proteine konkurrieren mit Transkriptionsfaktoren um Bindungstellen in der methylierten DNA oder organisieren die DNA in dicht gepackte Chromatin-Strukturen (Boyes und Bird, 1992).

Die Promotorregion des TFPI-2-Gens wurde ebenfalls mit der DHPLC-Methode analysiert. Hierfür wurde ein 729 bp großes Fragment stromaufwärts vom Translationsstart untersucht. Es wurden erstmals sieben verschiedene Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A in der Promotoregion des TFPI-2-Gens in Apoplex-Patienten und Blutspendern identifiziert (Siegling *et al.*, 2004). Zwei Sequenzvariationen -546C>T und -18C>A wurden nicht bei den Blutspendern detektiert. Alle Patienten waren heterozygot für die beschriebenen Sequenzvariationen, nur ein Blutspender war homozygot für die Sequenzvariation -47C>A. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der allelischen Häufigkeit zwischen Apoplex-Patienten und Blutspendern festgestellt.

Für die Patienten nach *Stent*-Implantation wurden die gleichen Sequenzvariationen wie für die Apoplex-Patienten detektiert. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Sequenzvariationen -587G>T und -98C>T identifiziert. Alle Patienten waren heterozygot für die beschriebenen Sequenzvariationen. Die allelische Häufigkeit der Sequenzvariationen zwischen den Patienten nach *Stent*-Implantation und den Blutspendern war nicht signifikant unterschiedlich. Die Sequenzvariationen -546T>C und -353A>G traten sowohl für die Apoplex-Patienten als auch für die Patienten nach einer *Stent*-Implantation gekoppelt auf.

Die untersuchte Promotorregion des TFPI-2-Gens wurde auf mögliche Bindungsstellen für humane Transkriptionsfaktoren mit der *Transkriptional Element Search Software* untersucht. Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die nach Bindung an die DNA als molekulare Schalter wirken und die Transkription an- oder ausschalten.

Die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren variieren von Gen zu Gen, so dass immer nur Teilbereiche entsprechend dem Gewebetyp oder dem Entwicklungsstadium exprimiert werden. Ein Transkriptionsfaktor setzt sich aus einer DNA-Bindungsdomäne, einer Aktivierungsdomäne und einer Dimerisierungsdomäne zusammen. Die Sequenzvariationen -546T>C und -18C>A sind in möglichen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und SP-1 lokalisiert.

Oct-1, sogenannte Octamer-bindende Proteine kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und besitzen vielfältige Funktionen. So werden nicht nur Haushaltsgene kontrolliert, sondern auch viele gewebespezifische Gene u.a. die Interleukine IL-2, 8, 3 und 5.

Oct-1 nimmt an der Replikation von Adenoviren und des eukaryotischen Genoms teil, sowie an der Anheftung von Chromatin-Schleifen an die Kernmembran und an der Bildung von Anheftungsregionen der Matrix. Des Weiteren ist Oct-1 an der Apoptose und an der Kontrolle der Embryonalentwicklung beteiligt (Sytina und Pankratova, 2003). Die POU-Domäne besteht aus zwei Teilen, im aminoterminalen Teil liegt der POU-spezifische Teil gefolgt von der POU-Homöobox (Ryan und Rosenfeld, 1997; Phillips und Luisi, 2000; Sturm *et al.*, 1988). Beide Teile der Domäne können sich unabhängig voneinander zum Helix-Turn-Helix-Motiv falten. Die jeweils dritte  $\alpha$ -Helix ist in der Erkennungshelix und lagert sich in die große Rinne der DNA (Klemm *et al.*, 1994).

Sp-1 bindet an GC-Boxen und besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer DNA-bindenden und einer Aktivierungsdomäne. Die DNA-bindende Domäne hat drei hintereinandergeschaltete Zink-Finger-Motive. Am Beginn jeder Folge befinden sich zwei benachbarte Cysteinreste und am Ende zwei Histidinreste, die gemeinsam mit ihrer Seitenkette ein Zinkion binden (Kadonaga *et al.*, 1987; Briggs *et al.*, 1986; Westin *et al.*, 1988; Kadonaga *et al.*, 1988). Die dreidimensionale Struktur des Zinkfingers ist aus einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt und einer kurzen  $\alpha$ -Helix aufgebaut. Die  $\alpha$ -Helix lagert sich im Bereich der GC-Box in die große Rinne der DNA. GC-Boxen kommen besonders häufig in TATA-freien Haushalts-Gen-Promotoren vor. Hierbei hat das DNA-gebundene Sp-1 eine besondere Funktion, indem es dabei hilft, den Transkriptionsfaktor TFII-D an die richtige Stelle in der Region des Translationsstarts zu platzieren.

Sequenzvariationen in Transkriptionsfaktorbindungsstellen beeinflussen möglicherweise die Regulation des TFPI-2-Gen-Promotors. Variationen in der DNA-Sequenz verändern möglicherweise die Affinität der bestehenden DNA-Interaktionen, oder ermöglichen die Bindung neuer Proteine an die DNA und verändern die Spezifität und die Kinetik des transkriptionellen Prozesses (Knight, 2003). SNP's in regulatorischen Regionen können mit Testsystemen, die Protein-DNA-Interaktionen wie zum Beispiel *DNA-footprinting*, *Gel-shift* und mit Genexpressionstest, welche die Genexpression des Reportergens messen, untersucht werden. Um den Einfluß der Sequenzvariationen auf die Promotoraktivität zu untersuchen, wurde das WT-TFPI-2-Promotorfragment 716 bp stromaufwärts vom Translationsstart in einen SEAP-Reporter-Gen-Vektor, ohne eigenen eukaryotischen Promoter oder *Enhancer*, kloniert.

Die Sequenzvariationen -567C>T, -546C>T, -353A>G, -167G>A, -161G>C, -47C>A und -18C>A wurden mittels *site-directed* Mutagenese hergestellt. HEK-293-Zellen wurden mit SEAP-cDNA, die das WT-TFPI-2-Promotorfragment enthält und mit Mutanten, die jeweils einen Nukleotidaustausch enthalten, transfiziert. Die höchste SEAP-Aktivität wurde für das WT-TFPI-2-Promotorfragment bestimmt. Alle Mutanten zeigten interessanterweise eine 1,3-2,8-fach reduzierte SEAP-Aktivität im Vergleich mit dem Wildtyp ( $p < 0,05$ ).

Die SEAP-Aktivität der Mutanten -546C>t und -18C>A, die in möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen für Oct-1 und Sp-1 lokalisiert sind, waren auf 52% und 36% vermindert. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente haben gezeigt, dass genetische Variationen in der Promotorregion des TFPI-2-Gens die Promotoraktivität beeinflussen. Um zu gewährleisten, dass die Transfektionseffizienz immer gleich ist sollte in einem weiteren Experiment eine Co-Transfektion durchgeführt werden. Parallel dazu sollten verschiedene Zelllinien getestet werden. Eine Auf- oder Abregulierung der TFPI-2-Aktivität wirkt möglicherweise auf die Modulation der extrazellulären Matrix, die Tumordinvasion, die Invasion von glatten Muskelzellen und die TFPI-2-Konzentration im Blut.

In einer Studie wurde gezeigt, dass Mutationen in einer der zwei AP-1 Stellen (-310 bis -310 und -163 bis -154), oder in einer der zwei SP-1 Stellen (-192 bis -183 und -135 bis -128) zu einer verminderten TFPI-2-Aktivität führen (Konduri *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde mit *in vitro* DNA-Methylierungsexperimenten und mit TFPI-2/Luziferase-Promotorkonstrukten eine verminderte Promotoraktivität im Vergleich mit einem unmethylierten Promotor nachgewiesen (Konduri *et al.*, 2003 und Hube *et al.*, 2003).

Der Methylierungsstatus von CpG-Stellen wurde, in einer Region -207/+48 von der Translationsstartstelle des TFPI-2-Gens, für normale und tumorgene Trophoblastenzellen bestimmt. Von 24 CpG-Stellen waren 97,5% methyliert in JAR-Zellen und exprimierten keine TFPI-2 mRNA. Im Gegensatz dazu waren nur 6,3% der 28 CpG-Stellen in normalen Trophoblastenzellen, die große Mengen an TFPI-2 mRNA synthetisieren, methyliert. Nicht methylierte Regionen zwischen -112/-63 und -18/+14 (CpG 12-18 und 24-27) erlauben möglicherweise die TFPI-2-Transkriptionsinitiation in JAR-Zellen. Hypermethylierung in Regionen zwischen -183/-113 und -54/-20 (CpG 4-11 und 19-23) scheinen notwendig aber nicht ausreichend zu sein, um die TFPI-2-Synthese zu unterdrücken (Hube *et al.*, 2003). In SNB19-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Methyl-CpG-bindenden Proteins 2 (MeCP2) die Aktivität des TFPI-2-Promotors reaktiviert (Konduri *et al.*, 2003).

#### **4.4. Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte TFPI-1, -2 und die [P151L]TFPI-1-Mutante kloniert und rekombinant in COS-1-Säugerzellen und *High Five*-Insektenzellen dargestellt werden. Für weitere Untersuchung der rekombinant exprimierten Proteine müssen diese in größeren Mengen produziert werden. Hierfür müssen für beide Expressionssysteme stabile Klone hergestellt werden und spezielle Aufreinigungsverfahren etabliert werden, um die rekombinanten Proteine anschließend bezüglich ihrer strukturellen und pathobiochemischen Eigenschaften näher charakterisieren zu können.

Des weiteren bieten die in einem COS-1-Säugerzell- und in einem *High Five*-Insektenzell-Vektorsystem klonierten TFPI-Gene die Möglichkeit, weitere Mutanten herzustellen und mit dem Wildtyp zu vergleichen. Zum Beispiel können Sequenzvariationen in den kodierenden Bereichen der TFPI-Genen mit der DHPLC-Methode detektiert und Mutanten hergestellt werden, um den Einfluss der Sequenzvariationen auf die Aminosäuresequenz zu untersuchen. Die TFPI-Gene und die Promotorregion des TFPI-2-Gens wurden mittels DHPLC erstmals in Apoplex-Patienten und Patienten nach einer *Stent*-Implantation untersucht. Die Primer und die DHPLC-Analysebedingungen wurden hierfür etabliert.

In der Promotorregion des TFPI-2-Gens wurden mehrere Sequenzvariationen detektiert. Um eine gesicherte Aussage über die Bedeutung der identifizierten Sequenzvariationen treffen zu können, müssen multizentrische Studien durchgeführt werden. Des weiteren ist es notwendig, einen ELISA für die Quantifizierung der TFPI-2-Konzentration im Blutplasma zu entwickeln.

Das Promotortestsystem kann für die Untersuchung weiterer Mutanten verwendet werden, wie zum Beispiel für die noch nicht untersuchten Sequenzvariationen -587G>T und -98C>T der Patienten nach *Stent*-Implantation.

Um die Bedeutung der Sequenzvariationen -546T>C und -18C>A in möglichen Bindungsstellen für die humanen Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp-1 untersuchen zu können, sind weitere Studien notwendig. So können zum Beispiel Protein-DNA-Interaktionen mit einem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) *in vitro* untersucht werden.

## 5 Methoden

### 5.1. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben sind alle hier angewandten molekularbiologischen Methoden nach Standardprotokollen oder Herstellerangaben durchgeführt worden (Maniatis *et al.*, 1989).

#### 5.1.1. Nukleinsäureextraktion

##### 5.1.1.1. Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Plasmidisolierung beruht auf einer modifizierten alkalischen Zellyse und anschließender Bindung von DNA an eine Anionenaustauschermatrix unter Niedrig-Salz- und pH-Bedingungen (Birnboim und Doly, 1979). Das *QIAprep Spin Miniprep Kit* wird für kleine DNA Mengen, das *High Speed Plasmid Midi Kit* und das *QIAfilterPlasmid Maxi Kit* für größere DNA Mengen verwendet.

##### Plasmidisolierung - Mittlerer Maßstab

Für die Plasmidisolierung werden 50 ml (*high-copy*-Plasmid) bzw. 100 ml (*low-copy*-Plasmid) Bakterienkultur angeimpft und über Nacht unter Selektionsdruck des entsprechenden Antibiotikums bei 37°C angezogen. Es werden das *QIAfilterPlasmid Maxi Kit* und das *QIA High Speed Midi Kit* von Qiagen eingesetzt. Bakterienzellen werden mit NaOH lysiert. Unter alkalischen Bedingungen erfolgt die Denaturierung von chromosomaler und Plasmid-DNA. Durch Zugabe von Kaliumacetat werden die chromosomale DNA und andere zelluläre Bestandteile präzipitiert. Die Plasmid-DNA wird in die *supercoiled* Form umgewandelt und befindet sich im Überstand der Lösung. Der Überstand wird auf eine Qiagen-Säule gegeben. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wird mit Isopropanol gefällt und anschließend mit Ethanol gewaschen.

##### 5.1.1.2. Isolierung von genomischer DNA aus EDTA-Vollblut

Zur Isolierung von genomischer DNA wird das *QIAamp DNA Blood Mini Kit* von Qiagen verwendet. Hierfür werden Blutzellen enzymatisch lysiert. Dazu werden 20 µl *Qiagen*-Proteinase K, 200 µl Vollblut und 200 µl Lysepuffer AL in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben, gemischt und im Wasserbad für 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wird das Lysat auf eine Silikat-Säule pipettiert und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert.

Es folgen zwei Waschschr itte mit 500 µl Puffer AW1 und Puffer AW2. Pufferreste werden durch erneutes Zentrifugieren entfernt. Die DNA wird mit 200 µl AE-Puffer nach 5 minütiger Inkubationszeit eluiert und bei -20°C gelagert.

### 5.1.1.3. Extraktion von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus adh erent wachsenden Zellen erfolgt mit dem *Qiagen RNeasy® Mini Kit* der Firma Qiagen. Adh erent wachsende Zellen ( $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$ -Zellen) werden von der Kultivierungsoberfl ache abgelöst und gewaschen. Nach Zentrifugation wird das Zellpellet durch Zugabe eines Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffers lysiert und über eine *QIAshredder*-Säule homogenisiert. Die Aufreinigung erfolgt über eine Silikat-Säule. Die RNA wird nach der Bindung an die Kieselgelmatrix der Säule gewaschen und in RNase-freiem Wasser eluiert. Es werden bis zu 4 µl Ribonuklease-Inhibitor (*RNAseOUT™*) zur Probe gegeben und diese bei -20°C gelagert.

### 5.1.2. cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die Synthese von kodierender DNA erfolgt durch die reverse Transkription von isolierter RNA aus humanen Zellen [Kawasaki *et al.*, 1991].

Probenansatz:        6 µl Gesamt-RNA *Template*  
                          1 µl Oligo-dT Primer  
                          6 µl H<sub>2</sub>O

Der Probenansatz wird 8 min bei 80°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Pufferansatz:        4 µl 5x *Reverse Transcriptase* Puffer  
                          2 µl DTT (0,1 M)  
                          1 µl dNTP (je 25 mM dATP, cCTP, dGTP und dTTP)  
                          1 µl RNase Inhibitor

Der Pufferansatz wird zum Probenansatz pipettiert und für 3 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl *SuperScript (Reverse Transcriptase)* wird für 90 min bei 42°C inkubiert. Die cDNA kann direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

### 5.1.3. Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden mit der horizontalen Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. DNA-Fragmente wandern aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode.

Für die Herstellung des Gels wird Agarose in 100 ml TBE-Puffer (90 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,3) erhitzt, vollständig gelöst und nach Zugabe von 15 µg Ethidiumbromid in eine Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird der Kamm herausgezogen und in eine mit 1xTBE-Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die mit 20% Auftragspuffer (0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 60% Saccharose in H<sub>2</sub>O) versehenen Proben werden in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von ca. 120 Volt und maximaler Stromstärke für etwa 35 bis 40 min aufgetrennt. Die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol im Auftragspuffer zeigen als sichtbare Probenfront den Verlauf der Elektrophorese an. Das Gel wird in der Geldokumentationsanlage unter UV-Licht ausgewertet. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und erzeugt eine sichtbare Fluoreszenz.

### 5.1.4. Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Ein DNA-Längenstandard wird bei der Elektrophorese von Agarosegelen mitgeführt. Die Länge der DNA wird anhand der Laufstrecke der Probe im Vergleich zum Längenstandard bestimmt. Es werden die DNA Marker pUC19/MspI und die 1 kb DNA-Leiter von MBL und Invitrogen verwendet.

### 5.1.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Aus einem Agarosegel kann die DNA durch Adsorption an eine Kieselgelmatrix unter Hochsalzbedingungen isoliert werden. Hierfür wird das *QIAEXII-Kit* verwendet. Mit einem sterilen Skalpell wird die DNA-Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Die Agarose wird durch Zugabe von Puffer und *QIAEXII* gelöst und die DNA an die Kieselgelmatrix gebunden.

Nach Zentrifugation und mehrmaligem Waschen wird das Pellet getrocknet. Die DNA wird in 20 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Hierfür wird das Pellet resuspendiert, zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand aufbewahrt.

### 5.1.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen (Saiki *et al*, 1988). Der DNA werden im Überschuss zwei kurze Oligonukleotide (Primer) zugesetzt, die nach einer kurzen Denaturierung bei 94°C an je einen der komplementären DNA-Stränge so hybridisieren, dass ihre 3'-OH-Enden zueinander gerichtet sind. DNA-Polymerasen heften Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende der Oligonukleotide und synthetisieren komplementäre DNA-Sequenzen. Der Denaturierungs-, Hybridisierungs- und DNA-Synthese-Zyklus wird 30-40 mal wiederholt. Es wird eine *Hotstart*-Polymerase eingesetzt, die durch einen initialen Denaturierungsschritt aktiviert wird.

#### PCR-Ansatz: (50 µl):

- 2,0 µl *Template*-DNA (Genomische-DNA, Plasmid-DNA)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer
- 1,0 µl *forward* Primer (25 µM)
- 1,0 µl *reverse* Primer (25 µM)
- 0,5 µl dNTPs (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 0,3 µl *HotStar*-Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 40,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub>

#### PCR-Reaktion im *Thermocycler*:

- |      |         |        |                                   |
|------|---------|--------|-----------------------------------|
| 1x   | 95°C    | 15 min |                                   |
| 35 x | 95°C    | 1 min  | Denaturierung                     |
|      | 45-75°C | 1 min  | <i>Annealing</i> der Primer       |
|      | 72°C    | x min  | <i>Extension</i> (1 min für 1 Kb) |
| 1x   | 72°C    | 10 min |                                   |
| 1x   | 4°C     | 10 min |                                   |

### 5.1.7. Aufreinigung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten

Der *QIAquick PCR Purification Kit* dient zur Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten. Zur DNA-Probe werden 5 Volumenteile Puffer PB gegeben. Die *QIAquick* Säule wird auf ein 2 ml Auffanggefäß gesetzt. Die mit dem Puffer PB gemixte Probe wird auf die Säule aufgetragen und für 30-60 s zentrifugiert. Die DNA bindet an die Kieselgelmatrix der Säule in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Mit 0,75 ml Puffer PE wird gewaschen und für 30-60 s zentrifugiert. Der Waschpuffer wird durch 2 minütiges Abzentrifugieren vollständig entfernt. In ein neues Eppendorfgefäß wird die DNA durch Hinzufügen von 50 µl Puffer EB (oder dH<sub>2</sub>O) eluiert.

### 5.1.8. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen prokaryotischer Herkunft, die doppelsträngige DNA-Sequenzen spezifisch spalten können, indem sie je eine Phosphodiesterbindung auf beiden Seiten aufbrechen. Die Spaltung von Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzym und entsprechendem Puffer, Inkubationstemperatur und Inkubationszeit erfolgt nach Angaben des Herstellers. Für die Spaltung von 1 µg Plasmid-DNA wird 1 *Unit* eines geeigneten Restriktionsenzym eingesetzt. Bei analytischen Plasmid-Spaltungen wird 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl gespalten. Präparative Plasmid-Spaltung und Verdau von chromosomaler DNA werden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt.

### 5.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor- und *Insert*-DNA werden für die Ligation vorbereitet, aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub> aufgenommen. Es wird ein 3-7-facher *Insert*-Überschuß zum Ligationsansatz gegeben. Ein 10 µl Ligationansatz enthält 2 µl 5x Ligase-Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, 1 µl Vektor und 6 µl *Insert*-DNA. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C oder für 3-18 h bei Raumtemperatur (*sticky* bzw. *blunt end* Ligation) (Wang *et.al*, 1994).

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

Hierfür wurde das *TOPO TA Cloning Kit* von der Firma Invitrogen verwendet. Der pCR-2.1-TOPO-Vektor liegt linearisiert im Komplex mit Topoisomerasen vor und verfügt über ein 3'-überhängendes Desoxythymidin. Mit *Taq*-Polymerasen amplifizierte PCR-Produkte verfügen über ein 3'-überhängendes Deoxyadenin. Die Ligation des DNA-Fragments in den Vektor erfolgt über die Topoisomerase I.

#### Ligationsansatz:

- 2 µl frisches PCR-Produkt
- 1µl *Salt Solution* von Invitrogen
- 1 µl pCR-2.1-TOPO- Vektor

Der Ligationsansatz wird vorsichtig auf Eis gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf Eis gelagert und sofort für die Transformation eingesetzt.

Werden PCR-Produkte aus einem Agarosegel eluiert, dann muß ein Adeninende angefügt werden, da diese sehr hydrolyseempfindlich sind.

5 µl PCR-Ansatz

0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)

0,2 µl dNTPs (je 25 mM)

Der Ansatz wird für 15 min bei 72°C inkubiert und anschließend direkt in die Ligasereaktion eingesetzt.

### 5.1.11. *Site-directed* Mutagenese

Für die *site-directed*-Mutagenese wird das *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* von der Firma Stratagene verwendet. Es wird ein doppelsträngiger DNA-Vektor mit einem *Insert* für die Mutagenese benötigt. Anschließend wird eine spezielle PCR mit spezifischen Primern, die eine Punktmutation, eine Deletion oder eine Insertion enthalten, durchgeführt. Eine *Pfu Turbo* DNA-Polymerase verlängert die Primer bis ein mutagenisiertes Plasmid mit kurzen Unterbrechungen entsteht. Parentale DNA wird mit *DpnI* verdaut. *XL Gold* ultrakompetente Zellen werden mit der dsDNA transformiert und die Unterbrechungen des mutagenisierten Plasmids werden repariert. Die Primer Auswahl erfolgt mit dem QuikChange Programm unter: <http://labtools.stratagene.com/QC>.

#### Reaktionsansatz: (50 µl)

5 µl 10x Reaktionspuffer

1 µl Plasmid-DNA

1 µl Primer 1 (125 ng)

1 µl Primer 2 (125 ng)

1 µl dNTPs

3 µl *QuickSolution*

38 µl dH<sub>2</sub>O

+ 1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Reaktionsbedingungen:

1x 95°C 1 min  
18x 95°C 50 sec.  
60°C 50 sec.  
68°C 6 min  
1x 68°C 7 min  
→ 2 min auf Eis (<37°C)

Das amplifizierte Produkt wird mit 1 µl *DpnI* für 1 h bei 37°C verdaut und anschließend werden 2 µl für die Transformation eingesetzt.

### 5.1.12. DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge einer DNA-Probe bestimmt. Die Methode beruht auf der Herstellung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und deren anschließender elektrophoretischen Auftrennung (Sanger *et al.*, 1977). Es wurde das *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaktion Kit* der Firma Perkin Elmer verwendet. Der Sequenzieransatz enthält neben Desoxynukleotiden (dNTPs) außerdem Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche bei ihrem Einbau aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe am Zuckerbaustein im Nukleotid einen Abbruch der Komplementärstrangsynthese verursachen. Die ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dieses als *cycle sequencing* bezeichnete Verfahren resultiert in einer linearen Anreicherung unterschiedlich langer fluoreszenz-markierter Produkte. Bei der automatisierten Auftrennung der markierten Fragmente im Kapillarsequencer werden die Fragmente fluorometrisch detektiert und die DNA-Sequenz ermittelt.

Sequenzier-PCR-Reaktion: (20 µl)

6,0 µl aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid-DNA  
1,5 µl *reverse* bzw. *forward* Primer (2,5 µM)  
2,0 µl *BigDye v1.1 Premix*  
2,0 µl *BigDye Sequencing Buffer (5X)*  
8,5 µl Wasser (*Rotisolv*<sup>®</sup> *HPLC-Gradient Grade*)

Thermocycler-Protokoll

2 min	95°C		
25 Zyklen:	10"	96°C	Denaturierung
	10"	48°C	Annealing
	4'	60°C	Extension

Der Reaktionsansatz wird vor der Analyse über eine Gelfiltration mit *Micro Bio-Spin P-30 Tris* Chromatografiesäulen von Bio-Rad aufgereinigt. Die Säule wird mehrmals invertiert und bei 1.000 x g für 2 min zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu verdichten. Der Reaktionsansatz wird ohne Mineralöl auf die Gelmatrix gegeben und bei 1.000 x g für 4 min eluiert. Das Eluat wird mit 20 µl Wasser (*Rotisolv®HPLC-gradient grade*) verdünnt und für 3 min bei 94 °C denaturiert.

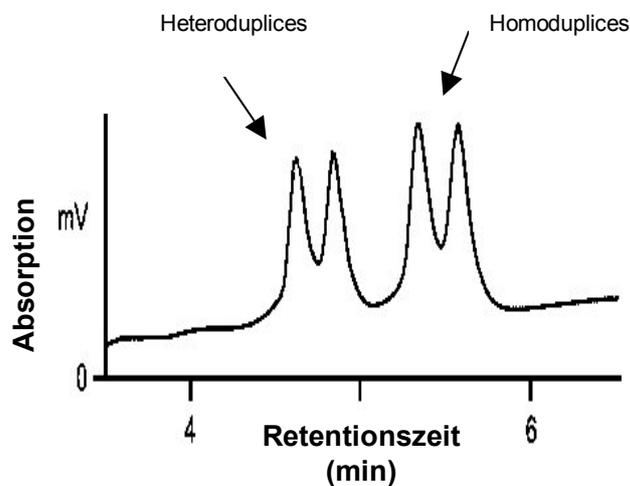
Die Auftrennung des Sequenzieransatzes und die Fluoreszenzdetektion erfolgt im *ABI Prism Collector 310* (Perkin Elmer). Das elektrophoretische Laden der Probe erfolgt für 20 s bei einer Spannung von 2-15 kV. Die Kapillarelektrophorese wird bei 15 kV und 50°C für 35-45 min durchgeführt.

**5.1.13. Mutationsanalyse mittels DHPLC**

Die denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) kombiniert die Heteroduplexanalyse mit einer Ionenpaar-Umkehr-Phasen-HPLC und beruht auf einem Verfahren nach Xiao und Oefner, 2001. Diese Methode nutzt das unterschiedliche Schmelz- und Elutionsverhalten von Hetero- und Homoduplices. Hierfür werden PCR-Amplifikate des zu untersuchenden Genabschnitts gebildet und mit amplifizierter Wildtyp-DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Proben werden anschließend für 5 min bei 94°C denaturiert und in einem Temperaturgradienten in 2°C Schritten innerhalb von 40 min auf 8°C gekühlt. Nach Hitzedenaturierung und Renaturierung kommt es zur Ausbildung von Homo- bzw. Heteroduplices. Die DHPLC-Analyse erfolgt bei Temperaturen bei der die DNA partiell denaturiert vorliegt. Heteroduplex-DNA hat eine kürzere Retentionszeit und wird eher von der Säule eluiert (Abb. 5-1). Die DHPLC-Analysebedingungen ( $T_M$ , Acetonitril-Gradient) werden für jedes zu untersuchende DNA-Fragment über die DNA-Sequenz mit Hilfe des Programms *Wavemaker 4.1.42* berechnet. Zur optimalen Trennung von Homo- und Heteroduplices wird eine Analysetemperatur gewählt, bei der ca. 50-80 % des DNA-Fragmentes als  $\alpha$ -Helix vorliegt. Zur Trennung von Nukleinsäuren werden Kapillarsäulen (*DNA-Sep®Cartridge*, Transgenomic) mit einer hydrophoben stationären Phase verwendet. Die hydrophobe Matrix der Säule besteht aus alkylierten Polystyrol-Divinylbenzol (PS-DVB)-Partikeln.

Die mobile Phase setzt sich aus den Puffern A und B zusammen (A: 0,1 M Triethylammoniumacetat in *HPLC-Gradient Grade-H<sub>2</sub>O*; B: 0,1 M Triethylammoniumacetat, 25 % Acetonitril in *HPLC-Gradient Grade-H<sub>2</sub>O*).

Die DNA-Fragmente werden über ein Brückenmolekül, das Triethylammoniumacetat (TEAA), an die hydrophobe Matrix der Säule gebunden. Zur Trennung der Nukleinsäuren wird der Anteil an Puffer B, also die Acetonitrilkonzentration, in der mobilen Phase langsam erhöht. Die Affinität der DNA-Fragmente zur stationären Phase nimmt mit steigender Acetonitrilkonzentration ab und die DNA-Fragmente werden schließlich von der Säule eluiert. Die Detektion der eluierten DNA-Fragmente erfolgt mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Puffer werden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min über die Kapillarsäule gepumpt.



**Abb. 5-1:** Das Chromatogramm zeigt die Elution von Hetero- und Homoduplexes. Dargestellt ist die Absorption (mV) gegen die Retentionszeit.

## 5.2. Zellbiologische Methoden

### 5.2.1. Kultivierung von Bakterien

#### 5.2.1.1. Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur und auf Festmedien

*E.coli*-Stämme werden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Ampicillin (100 µg/ml) wird als Selektionsmarker verwendet.

#### 5.2.1.2. Kultivierung von Bakterien in einer Glycerinkultur

Bakterienstämme werden in LB-Medium mit 10-20% Glycerin bei -80°C eingefroren.

### 5.2.1.3. Transformation von chemisch-kompetenten *E.coli* TOP 10-Zellen

Chemisch-kompetente *E.coli* TOP 10-Zellen werden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l Ligationsansatz wird vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen einem Hitzeschock im Wasserbad für 30 s bei 42°C ausgesetzt. Die Zellen werden für 2 min auf Eis inkubiert. Es wird 250  $\mu$ l SOC-Medium zum Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es werden 50-100  $\mu$ l Ansatz auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei der TOPO TA-Klonierung wird der Reaktionsansatz auf X-Gal-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Klone, die DNA in das Plasmid inseriert haben, erscheinen weiß, da der Genlokus für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Insertion unterbrochen wird. Klone ohne inserierte DNA erscheinen blau, da sie X-Gal mittels  $\beta$ -Galaktosidase umsetzen können.

### 5.2.1.4. Transformation von *E.coli* XL 10-Gold-Zellen

XL 10-Gold ultrakompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Zellen gemischt und für 10 min inkubiert.

Zu den kompetenten Zellen werden 2  $\mu$ l *DpnI* verdautes amplifiziertes Produkt gegeben und für 30 min inkubiert. Auf den Hitzeschock für 30 s bei 42°C werden die Zellen für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,5 ml SOC-Medium werden die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Es werden 100-200  $\mu$ l Ansatz auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 5.2.2. Kultivierung von humanen und tierischen Zellen

### 5.2.2.1. Kultivierung von verschiedenen eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen werden in Zellkulturflaschen bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid und 99% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für COS-1-Zellen wird MEM-Medium und für HEK-293-Zellen DMEM-Medium verwendet. Die Medien werden mit 10% fötalem Kälberserum, 1% Antibiotikallösung und 1% Glutamin versetzt.

Eine zu ~80 % konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wird zur weiteren Vermehrung passagiert. Das alte Medium wird entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS-Lösung) werden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lassen sich ablösen und werden mit 5 ml Medium aufgenommen. Es wird für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wird in 2 ml Medium resuspendiert und davon werden 80-100  $\mu$ l in eine neue Zellkulturflasche mit 12 ml Medium gegeben.

### 5.2.2.2. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Säugerzellen werden mit *Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent* von Roche transfiziert. Das aus mehreren Komponenten bestehende Lipid-haltige Reagenz, bildet einen Komplex mit der DNA und transportiert diese in die Zelle.

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion in kleine Zellkulturschalen (35 mm) ausgesät. Am Tag des Experiments soll eine Konfluenz von 50-80% vorliegen. Zu 100 ml Medium ohne FCS werden Reagenz und DNA im Verhältnis 3:2, 3:1 und 6:1 gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min werden die Ansätze auf die Zellen getropft. Der Zellkulturüberstand wird nach 48 bzw. 72 h abgenommen und die Expression kontrolliert. Um die Transfektionseffizienz zu kontrollieren, werden die Zellen parallel dazu mit dem Vektor pcDNA4/HisMax-*lacZ* transfiziert. Nach 48 h und 72 h werden die Zellen mit einer X-Gal-Färbung angefärbt und die Transfektionsrate in Prozent bestimmt. Für die Selektion eines stabilen Klons werden Zellen, die mit dem Vektor pSec/Tag2HygroA, B, C transfiziert wurden, mit Hygromycin behandelt.

#### X-Gal Färbung:

Methode: Nur Zellen, die den Vektor pcDNA4HisMaxLacZ enthalten und noch vital sind nehmen den Farbstoff auf.

Färbelösung frisch ansetzen:

- 100 µl X-Gal Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid)
- 20 µl Kaliumferricyanid (0.5 M in Wasser)
- 20 µl Kaliumferrocyanid (0.5 M in Wasser)
- 5 µl MgCl<sub>2</sub> (1M in Wasser)
- 1,85 ml PBS

Das alte Medium wird entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es wird Paraformaldehydlösung (PFA) zugeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird mit einer Pipette abgezogen und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wird ~1 ml Färbelösung pro 35 mm Schale zugegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach ~4 h werden die Zellen 1 mal mit PBS gewaschen und mit 70%igem Glyzerin fixiert.

### 5.2.2.3. Kultivierung von *High Five*-Insektenzellen

Adhärenz wachsende Insektenzellen werden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen der Firma Nunc bei 27°C kultiviert. *Insect Xpress* Medium mit 10 µg/ml Gentamycin wird als Zellkulturmedium verwendet. Eine zu ~80% konfluent mit Zellen bewachsene Kulturflasche wird passagiert. Das alte Medium wird abgesaugt und verworfen. Mit einer Pipette wird 10 ml frisches Medium aufgenommen, die Zellen werden von der Kulturflasche abgespült und in einem 15 ml *Falcon Tube* gesammelt. Die Zellen werden mit einer Pipette resuspendiert und es werden ~1,5-2,0 ml in eine neue Zellkulturflasche mit 23 ml Medium ausgesät. Das Medium wird alle 2-3 Tage gewechselt.

### 5.2.2.4. Transfektion von *High Five*-Insektenzellen

Die Liposomen-vermittelte Transfektion von *High Five*-Insektenzellen wird mit dem Transfektionsreagenz *Cellfectin* durchgeführt. Positiv geladene Liposomen und negativ geladene Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bilden aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung DNA-Liposomen-Komplexe. Diese Transfektionskomplexe gelangen durch Endocytose in das Zellinnere.

Transient transfizierte Zellen nehmen Fremd-DNA in den Zellkern auf, ohne diese in die Chromosomen zu integrieren. Die Selektion eines stabil transfizierten Insektenzellklons wird mit Blasticidin (2-10 µg/ml) durchgeführt, wenn die Vektoren pMIB-V5-HisA, -B oder -C als Basisvektoren für die Transfektion verwendet werden.

Am Vortag der Transfektion werden *High Five*-Insektenzellen passagiert und 2x10<sup>6</sup> Zellen in 60 mm Schalen ausgesät und für ~24 h bei 27°C inkubiert. Die Zellkulturschalen sind am Folgetag zu 50-60% konfluent bewachsen und können transfiziert werden. Zunächst wird eine Lösung A (100 µl serumfreies *Insect Xpress* Medium mit 1-10 µl Plasmid-DNA gemischt) und eine Lösung B (100 µl serumfreies *Insect Xpress* Medium mit 1-9 µl *Cellfectin* Reagenz gemischt) hergestellt. Lösung A wird zu Lösung B gegeben und es wird für 30 min bei RT inkubiert. Es wird 800 µl Medium zum Ansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Das alte Medium wird von den Zellen mit einer Pipette abgezogen, der Transfektionsansatz wird auf die Zellen getropft und für 3,5 h bei RT inkubiert. Die Schalen werden alle 15 min vorsichtig bewegt, um zu gewährleisten, dass alle Zellen benetzt sind. Es wird 2 ml *Insect Xpress* Medium mit Gentamycin zum Transfektionsansatz gegeben und bei 27°C inkubiert. Der Zellkulturüberstand wird nach 24, 48 und 72 h entnommen und die Genexpression kontrolliert.

### **5.2.2.5. Anlegen einer Rollerkultur von stabil transfizierten *High Five*-Zellen**

In eine große Rollerkulturflasche (2000 ml) werden 230 ml *Insect Xpress* Medium vorgelegt und 250 µl Blastocidin (5 mg/ml Stammlösung) dazugegeben. *High Five*-Zellen werden von 2 konfluent (80-90%) bewachsenen 175-cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml Restmedium abgelöst und in die Rollerkultur gegeben. Die Rollerkulturflaschen werden im Inkubator kontinuierlich bei 27°C und einer Drehzahl von 2 Umdrehungen pro Minute gedreht. Der Zellkulturüberstand wird nach einer Woche entnommen.

### **5.2.2.6. Kryokonservierung von Insektenzellen**

Es wird eine 175-cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, die zu 80-90% konfluent mit *High Five*-Insektenzellen bewachsen ist benötigt. Die Zellen werden abgelöst, in 10 ml Restmedium resuspendiert und für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Einfriermedium resuspendiert. Es werden jeweils 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben und in einer Styroporbox bei -80°C über Nacht eingefroren und dann in den Stickstoffbehälter überführt.

#### Einfriermedium:

42.5% konditioniertes *Insect Xpress* Medium

42.5% frisches *Insect Xpress* Medium

10% DMSO

5% FCS

## **5.3. Proteinchemische Methoden**

### **5.3.1. Aufkonzentrieren von Zellkulturüberstand**

Zellkulturüberstände werden durch Zentrifugation mit Hilfe von Mikrokonzentratoren aufkonzentriert. Es werden verschiedene Konzentratoren (Microcon YM-3, MWCO 3.000 von Amicon Bioseparations/Millipore; VIVAspin, MWCO 5.000, PES von VIVA Science) eingesetzt, abhängig vom Volumen des Zellkulturüberstandes und vom Molekulargewicht des Proteins.

### **5.3.2. Proteinnachweis mittels *Western-Blot***

Ein Proteingemisch aus aufkonzentriertem Zellkulturüberstand wird in einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die Immunodetektion erfolgt mit einem HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper (Anti-V5-HRP, Anti-His-HRP). Das Molekulargewicht der detektierten Proteinbande wird im Vergleich mit einem Größenstandard (*SeeBluePlus2*) ermittelt.

### **SDS-Elektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Anlagerung von Dodecylsulfationen denaturieren Proteine zu langgestreckten Polypeptidketten mit gleichmäßig verteilter, negativer Ladung. Diese werden im elektrischen Feld aufgetrennt und das Molekulargewicht im Vergleich mit einem Größenstandard ermittelt.

#### Probenvorbereitung: (25 µl)

16,25 µl aufkonzentrierter Zellkulturüberstand

6,25 µl Probenpuffer

2,5 µl Reduzierendes Agens

Es werden vorgefertigte Gradientengele NuPAGE Bis-Tris Gel (4-12%) von Invitrogen und NuPAGE MOPS-SDS-Laufpuffer bzw. MES-Laufpuffer verwendet. Des weiteren werden Tris-Glycin-Gele (8-16%) und der dazugehörige Laufpuffer der Firma Anamed eingesetzt. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt ~ 75 min und wird bei 120 V und 50 mA durchgeführt.

### **Western-Blot**

Es wird eine PVDF-Membran von Invitrogen verwendet. Der Transferpuffer wird mit 10% Methanol, 0,1% Antioxidanz und deionisiertem Wasser verdünnt. Die Blotzeit beträgt ~ 50 min bei 30 V und 170 mA.

Die Membran wird mit 2%igem BSA in 0,1 M Tris/HCL, pH 7,2 für 1 h geblockt und anschließend 3 Mal mit PBST (0,05 M PBS, pH7,4; 0,15 M NaCl und 0,5 ml/l *Tween-20*) gewaschen. Mit einem HRP-gekoppelten Antikörper (Anti-His-HRP oder Anti-V5-HRP, 1:1000 in PBST) von der Firma Invitrogen wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird 3 Mal gewaschen. Dann wird 1 Mal mit Citrat-Phosphat-Puffer (0,1 M Citronensäure, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, pH 5,0) gewaschen und mit einer Substratlösung inkubiert. Die Substratlösung setzt sich zusammen aus: 5 ml Citrat-Phosphatpuffer, 1 ml 4-Chloro-1-Naphtollösung (3 mg/ml in Methanol) und 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

Anhand eines mitgeführten Größenstandards *SeeBluePlus2* von Invitrogen kann das Molekulargewicht der detektierten Proteinbande bestimmt werden.

### 5.3.3. Dot-Blot

Im *Dot-Blot* wird ein Proteingemisch auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis erfolgt mit einem spezifischen monoklonalen Primärantikörper. Ein HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelter-Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Das Substrat wird nach Zugabe enzymatisch umgesetzt und ist als Farbreaktion erkennbar.

Es werden 0,5 µl 75%iges Methanol auf eine PVDF-Membran gegeben und 0,5 µl Probe dazu gegeben. Die Membran wird an der Luft getrocknet, anschließend kurz in Methanol geschwenkt und in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Membran wird für 60 min in einer 2%igen BSA-Lösung inkubiert. Diese wird entfernt und die Membran 3 Mal mit PBST (0,05 M PBS, pH7,4; 0,15 M NaCl und 0,5 ml/l *Tween*-20) gewaschen. Die Membran wird in einer Primärantikörper-Lösung (1:1000 in PBS) für 1-2 h bei RT inkubiert. Die Lösung wird entfernt und die Membran 3 Mal mit PBST gewaschen. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers (1:1000 in PBST) wird erneut für 1-2 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Lösung entfernt und die Membran 3 Mal mit PBST gewaschen. Die Membran wird in Citratpuffer (0,1 M Citronensäure, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, pH 5,0) äquilibriert und anschließend in einer Substratlösung (5,0 ml Citrat-Phosphat-Puffer, 1,0 ml 4-Chloro-1-Naphtollösung (3mg/ml in Methanol), 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) für 30-90 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wird durch Abspülen mit Wasser gestoppt.

### 5.3.4. Chromogener TFPI-Aktivitätstest

Der *ACTICHROME TFPI Activity Assay* von der Firma American Diagnostica ist ein chromogener Test für die Quantifizierung von aktivem TFPI im Plasma oder Zellkulturüberstand. Mit dem Test wird die inhibitorische Fähigkeit von TFPI auf die katalytische Aktivität des TF/FVIIa-Komplexes, FX zu FXa zu aktivieren, ermittelt. Nach Inkubation der Proben mit TF/FVIIa und FX wird die Restaktivität des TF/FVIIa-Komplexes gemessen mit *Spectrozyme*-FXa, einem spezifischen chromogenen Substrat, welches nur von FXa, gebildet im Test, gespalten wird. Hierbei wird *p-Nitroanilin* (pNA) als Chromophor freigesetzt. Die Absorption von pNA wird bei 405 nm gemessen und mit einer Standardkurve aus bekannten TFPI-Aktivitätswerten verglichen.

In eine Mikrotiterplatte werden jeweils 20 µl Probe, TFPI-Standard und Referenzplasma pipettiert. Es werden 20 µl Faktor VIIa/TF-Komplex hinzupipettiert und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird in jede Kavität 20 µl einer humanen Faktor X-Lösung hinzugefügt und die Platte für 15 min bei 37°C inkubiert. Es werden 20 µl EDTA-Lösung und danach 20 µl *Spectrozyme*-FXa-Lösung in jede Kavität gegeben und die Farbentwicklung für 25 min alle 5 min bei 405 nm detektiert.

### 5.3.5. Gesamt-TFPI Nachweis

Der *IMUBIND Total Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) ELISA von American Diagnostica ist ein Test für die Quantifizierung von TFPI in Citrat-Plasma und Zellkulturüberständen. Es werden intakte und verkürzte Formen von TFPI ebenso wie Komplexe mit *Tissue Factor* und Faktor VIIa erkannt. Die Nachweisgrenze für die Detektion beträgt 0,18 ng TFPI/ml. Es werden beschichtete Platten mit einem spezifischen polyklonalen humanen TFPI-Antikörper verwendet. Verdünnte Plasmaproben oder Zellkulturüberstände werden in der Mikrotiterplatte inkubiert. Gebundenes TFPI wird mit einem Biotin-markierten monoklonalen Antikörper spezifisch für die *Kunitz-Domäne 1* des TFPI detektiert. An den Antikörper ist Streptavidin-konjugierte HRP (*horseradish peroxidase*) gebunden.

Das zugegebene Substrat (TMB) wird von gebundenem Enzym umgesetzt. Die Sensitivität wird durch Zugabe einer Stopplösung (0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) erhöht, die zu einer Gelbfärbung führt. Die Absorption wird bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen und im Vergleich mit einer TFPI-Standardkurve die TFPI-Konzentration ermittelt.

### 5.3.6. Quantitative Bestimmung von PSA (*Prostate-specific antigen*)

Zellkulturüberstände von pSecTag2/Hygro/PSA transfizierten Säugerzellen werden auf PSA-Expression untersucht. Der PSA-IMMULITE-Test ist ein Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Immuntest der Firma DPC-Biermann.

Als Festphase werden mit polyklonalen PSA-Antikörpern beschichtete Polystyrolkugeln verwendet. PSA aus der zu untersuchenden Probe und ein zweiter mit alkalischer Phosphatase-markierter monoklonaler PSA-Antikörper bilden während der Inkubation bei 37°C einen *Sandwich-Komplex* aus. Eine Zentrifugal-Waschtechnik entfernt ungebundene Komponenten. Das zugegebene Chemilumineszenz-Substrat (PPD) wird von gebundenem Enzym umgesetzt und die dabei ausgelöste Lichtemission ist der PSA-Konzentration in den Proben direkt proportional.

### 5.3.7. Nachweis inhibitorischer Aktivität durch reverse Zymografie

Bei dieser Nachweismethode wird das Substrat in das Polyacrylamid-Gel einpolymerisiert. Die Inhibitor-haltige Probe wird gemeinsam mit dem zu hemmenden Enzym elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Herstellung eines Zymogrammgels werden 2,5 ml 40%iges Acrylamid/Bisacrylamid, 6,5 ml Wasser, 1,0 ml Substratlösung (1% Casein in 1 M NaOH, 50 mMTris; pH 7.5), 1 ml Tris-Glycin Laufpuffer [10x] und 3,3 µl TEMED vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von einer Spatelspitze APS wird erneut gemischt und das Gel gegossen.

Das auspolymerisierte Gel wird in eine SDS-Gelelektrophoresekammer gestellt und die Kammern mit Tris-Glycin Laufpuffer [1x] gefüllt. Die aufkonzentrierten Proben werden mit Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Laufzeit des Zymogramms beträgt 90 min und wird bei einer angelegten Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 35 mA durchgeführt.

Um den Inhibitor und das Enzym in die native Form zurückzufalten, wird das SDS zweimal 30 Minuten lang mit 2,5% (w/v) Triton X-100 aus dem Gel gewaschen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C in Entwicklungspuffer. Durch die anschließende Coomassie-Färbung können Proteinbanden auf farblosem Hintergrund an den Stellen nachgewiesen werden, wo aufgrund der Enzymhemmung kein Substratabbau möglich war.

### 5.3.8. BCA-Test für die Bestimmung der Proteinkonzentration

Für den BCA-Test werden 50-fach aufkonzentrierte Zellkulturüberstände 1:100 und 1:1000 verdünnt. In eine ELISA-Platte wird jeweils 10 µl des verdünnten Zellkulturüberstandes vorgelegt. Eine Reaktionslösung (10 ml BCA-Lösung + 0,2 ml CuII-Lösung) wird angesetzt und 200 µl werden jeweils zur vorgelegten Probe pipettiert. Die Platte wird vorsichtig gemischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Messung erfolgt am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Messwerte werden mit Hilfe einer zuvor ermittelten Standardkurve bestimmt.

### 5.3.9. Modifizierte PTT

Um die antikoagulatorische Aktivität von exogenem TFPI-2 zu bestimmen, werden 2 modifizierte verdünnte Thromboplastinzeiten (*diluted thromboplastin time* (dTT)) bestimmt, einmal mit und einmal ohne exogenem TFPI-2 (modifiziert nach Tardy-Poncet *et al.*, 2003).

Zellkulturüberstände mit rekombinant exprimierten TFPI-2 von COS-1-Säugerzellen und *High Five*-Insektenzellen werden 50-fach aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände wird mit einem BCA-Test ermittelt und auf eine identische Gesamtproteinkonzentration eingestellt.

Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen werden auf eine Gesamtproteinkonzentration von 5,93 µg/ml verdünnt. Als Kontrollen werden Zellkulturüberstände von COS-1-Zellen und von COS-1-Zellen, die mit dem Plasmid pSecTag2/HygroA transfiziert wurden, eingesetzt.

*High Five*-Zellen werden auf eine Gesamtproteinkonzentration von 2,58 µg/ml verdünnt. Als Kontrolle werden Zellkulturüberstände von *High Five*-Zellen und von Zellen, die mit dem Plasmid pMIB-V5-HisC transfiziert wurden, verwendet. Als weitere Kontrolle wird BSA mit einer Konzentration von 5,93 µg/ml bzw. 2,58 µg/ml zum Testansatz gegeben, um den Einfluss der Proteinkonzentration zu berücksichtigen.

Die Messung der dPTT wird am Kugelkoagulometer KC 10 durchgeführt.

Ansatz: 100 µl Citratplasma  
 + 5-25 µl Zellkulturüberstand +/- TFPI-2  
 + 100 µl Actin FS  
 → 2 min inkubieren bei 37°C  
 + 100 µl CaCl<sub>2</sub>

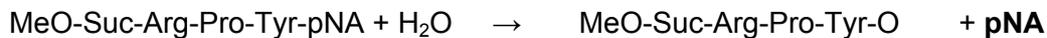
### 5.3.10. Chromogener Substrattest: Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von TFPI-2

Das chromogene Substrat S2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA) wird von Chymotrypsin umgesetzt, hierbei entsteht p-Nitroanilin (pNA). Die Freisetzung von pNA wird photometrisch am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die inhibitorische Aktivität von rekombinant exprimiertem TFPI-2 zeigt sich in einer verringerten Chymotrypsin-Aktivität.

#### TFPI-2

≠

Chymotrypsin



Es werden Zellkulturüberstände von COS-1-, von *High Five*-Zellen und von Zellen, die rWT-TFPI-2 exprimieren untersucht.

1. S-2586 Chromogenes Substrat (1 mmol/l)
2. Puffer Tris-Calcium pH 8,3 (25°C)
  - 12,1 g Tris (100 mmol/l)
  - + 56,2 g NaCl (960 mmol/l)
  - + 800 ml dH<sub>2</sub>O
 → pH mit ~ 50 ml 1 mol/l HCl auf 8,3 bei 25°C einstellen. Dann werden 10 ml CaCl<sub>2</sub> (1 mol/l) zugeben. Auffüllen auf einen Liter mit dH<sub>2</sub>O. Puffer bei 2-8°C lagern (2 Monate stabil).
3. Chymotrypsin-Probe in 1 mmol/l HCl lösen, eine Konzentration von 0,1 g/l herstellen und bei 2-8°C lagern (~ 2 Wochen stabil).
4. Vor dem Versuch wird die Chymotrypsin-Probe 1:200 mit 1 mmol/l HCl verdünnt. Wenn die Probe ein reines Protein ist, wird 1% Albumin oder 0,1 % Carbowax zugegeben, um Adsorption an die Oberfläche zu verhindern.

	<b>Probenansatz:</b>
Puffer	50 µl
Inkubieren bei 37°C für 3-4 min	
Chymotrypsin Probe	50 µl (1:200)
Zellkulturüberstand	50 µl (oder 5µl 50x aufkonz.)
Inkubieren bei 37°C für 2-3 min	
Chromogenes Substrat	50 µl

Messung: Tecan Photometer 405 nm bei 37°C

Berechnung der Chymotrypsin-Aktivität:  $U/l = 311 \times \Delta A / \text{min} \times 200$

### 5.3.11. SEAP-Chemilumineszenztest

Das *BD Great EscAPe SEAP Reporter System 3* und das *BD Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detection Kit* werden für die systematische Analyse eukaryotischer Promotor and *Enhancer* verwendet.

Das *BD Great EscAPe SEAP Reporter System 3* enthält zwei verschiedene Vektoren. Der pSEAP2-*Basic* Vektor enthält keinen eukaryotischen Promotor und keine *Enhancer*-Sequenzen und ist für die Analyse möglicher Promotorsequenzen geeignet. Auf eine multiple Klonierungsstelle folgt das SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-Reporter gen. Der Vektor wird ohne klonierten Promotor oder *Enhancer* als Negativkontrolle verwendet. Der pSEAP2-*Control* Vektor enthält das Reporter gen und zusätzlich einen SV40-Promotor und SV40-*Enhancer* und wird als Positivkontrolle verwendet.

Säugerzellen werden jeweils im Dreifachansatz mit der Negativkontrolle, der Positivkontrolle und dem klonierten Promotorfragment transfiziert. Es werden jeweils 1 µg Plasmid-DNA aus zwei verschiedenen Klonisolaten transfiziert. Die Zellkulturüberstände werden nach 48 und 72 h entnommen und bei -20°C gelagert.

Im anschließende Chemilumineszenztest wird die SEAP-Aktivität der Zellkulturüberstände gemessen. Der Test wird jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

Zunächst wird eine Standardkurve ermittelt und der lineare Messbereich festgelegt. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe mit *Positive Control Placental Alkaline Phosphatase* und *1xDilution* hergestellt. Es werden 13 µl nicht-transfizierter Zellkulturüberstand in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 2 µl einer *Positive Control Placental Alkaline Phosphatase*-Verdünnung hinzugefügt. Der Test wird nach Anleitung durchgeführt und gemessen. Die Standardkurve wird in jedem Test mitgeführt.

In einem weiteren Vorversuch wird die SEAP-Aktivität der zu untersuchenden Zellkulturüberstände gemessen. Liegen die Messwerte außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve, dann müssen die Zellkulturüberstände vor dem Test mit *1xDilution Buffer* verdünnt werden.

Chemilumineszenztest:

Für den Chemilumineszenztest werden die Zellkulturüberstände aufgetaut und jeweils 15 µl in eine weiße Mikrotiterplatte pipettiert.

Es werden 45 µl *1xDilution Buffer* zugegeben, anschließend wird die Platte mit einer Folie zugeklebt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Die Platte wird für 2-3 min auf Eis gelagert, damit die Proben auf RT abkühlen. Es wird jeweils 60 µl *Assay Buffer* zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl *CSPD Substrate* (1:20) wird die Platte für 10 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgt am *ELISA-Reader*, hierfür wird der Filter entfernt und der Test innerhalb von 10-60 min mehrmals gemessen, um die maximale Lichtemission festzulegen.

## 6 Material & Geräte

### 6.1. Bakterienstämme

#### **Escherichia coli TOP 10**

Invitrogen, Groningen, NL

Genotyp: *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS.mcrBC)$ ,  $\phi80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lac74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara, leu)7697$ , *galU*, *galK $\lambda$* , *rspL*, *endA1*, *nupG*

Der Bakterienstamm wird zur Transformation und Vermehrung rekombinanter Plasmide verwendet. Er ist rekombinationsdefekt (*recA*) und enthält kein Endonuclease A-Gen (*endA1*), was zu einer stabilen Plasmidreplikation führt. Die Aktivität endogener Restriktionsenzyme wird durch den Locus *hsdRMS* eliminiert.

#### **XL10-Gold ultrakompetente Zellen**

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Genotyp: *Tet<sup>R</sup>*  $\Delta(mcrA)183$   $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *Hte*, [*F' proAB laqZ* $\Delta M15$ Tn10 (*Tet<sup>R</sup>*) *Amy Cam<sup>R</sup>*]

XL-Gold ultrakompetente Zellen sind ein XL2-Blue *MRF'* Derivat. Die Zellen sind endonuklease- und rekombinationsdefekt.

### 6.2. Zelllinien

**COS-1** Nierenzelllinie, Grüne Meerkatze

DSM ACC 63 DSMZ, Braunschweig, D

**HEK** embryonale Nierenzelllinie, human

DSM ACC 63 DSMZ, Braunschweig, D

**SW 1353** Chondrosarkomzelllinie, human

ATCC HTB-94 ATCC, Rockville, USA

#### **High Five-Insektenzellen**

Invitrogen, San Diego, USA

*High Five*-Insektenzellen sind Ovar-Zellen des Kohlweißlings (*Trichopulsia ni*). Die adhären wachsenden Zellen sind fibroblastenähnlich, besitzen multiple Nuklei und sind teilweise von runder, teilweise von länglicher Gestalt. Sie sind für die Suspensions-Kultur geeignet und können serumfrei kultiviert werden.

### 6.3. Zellkulturmedien

#### Medien für die Kultivierung von Bakterienzellen

##### LB-Amp-Agar

- 1,0 % Pepton aus Fleisch
- 1,0% NaCl
- 0,5% Hefeextrakt
- 2,0% Agar
- 100 µg/ml Ampicillin

##### X-Gal-haltiger Agar

LB-Amp-Agar mit 64 mg/l X-Gal

##### LB-Amp-Flüssigmedium

- 1,0 % Pepton aus Fleisch
- 1,0% NaCl
- 0,5% Hefeextrakt
- 50-100 µg/ml Ampicillin

#### Medien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Insect Xpress (serumfrei) Cambrex Bio Science, Verviers, B

+ 10% Gentamycin

DMEM Medium PAA, Laboratories, Pasching, A

+ 10% Fötale Kälberserum, 1% Antibiotikallösung, 1% Glutamin

### 6.4. Plasmide

#### **pCR-2.1-TOPO**

Invitrogen, Groningen, NL

Das Plasmid eignet sich besonders gut für die Klonierung und Vermehrung von *Taq*-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmenten. Aufgrund des Ampicillin- bzw. Kanamycin-Selektionsdrucks wachsen nur Antibiotika-resistente Bakterienzellen.

Das *lacZ*-Gen wird durch die Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen, so dass erfolgreich transformierte Zellen aufgrund der Blau/Weiß-Selektion der Klone auf X-Gal-haltigen Agarplatten detektiert werden.

**pcDNA4/HisMax/lacZ**

Invitrogen, Groningen, NL

Das Plasmid, enthält ein *lacZ*-Gen und dient als Kontrolle für die Bestimmung der Transfektionseffizienz eukaryotischer Zellen. Die Transkription wird durch einen CMV-Promotor initiiert und die Translation durch das *Enhancer*-Element QBI SP163 verstärkt.

**pMIB-V5-HisC**

Invitrogen, Groningen, NL

Der Expressionsvektor pMIB/V5-His C enthält den OpIE2-Promotor für eine starke Expression des gesuchten Gens, das Honigbienen Melittin-Sekretionssignal (HBM) zur Sekretion des exprimierten Proteins sowie den OpIE1-Promotor zur Expression des Blasticidin-Resistenz-Gens, welches die Selektion stabiler Zellen erlaubt. Das rekombinant exprimierte Fusionsprotein enthält ein V5-Epitop und carboxyterminal ein 6xHis-Epitop. Die Detektion erfolgt mit einem Anti-V5-Antikörper bzw. Anti-(His-C-term)-Antikörper. Das Fusionsprotein kann mit Hilfe der Metall-Chelat-Chromatografie aufgereinigt werden.

**pSecTag2/HygroA**

Invitrogen, Groningen, NL

Der Vektor ist geeignet für die Expression von Proteinen in Säugerzellen. Er enthält ein  $\beta$ -Lactamase kodierendes Gen für die Selektion von Bakterien mit Ampicillin und ein Hygromycin-B-Resistenzgen für die Selektion in Säugerzellen. Proteine, die von diesem Vektor exprimiert werden, enthalten N-terminal eine Ig-kappa-Kettenleitsequenz und C-terminal ein *c-myc*-Epitop und 6 Histidinreste für die Detektion und Aufreinigung.

**pSEAP2-Basic**

BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA

Der Vektor enthält keine eukaryotischen Promotor- und *Enhancer*-Sequenzen und wird daher verwendet, um klonierte Sequenzen auf Promotor- bzw. *Enhancer*-Aktivitäten zu untersuchen. Auf eine Multiple Klonierungsstelle folgt ein Reporter gen (SEAP), das eine sekretorische Alkalische Phosphatase kodiert.

**IMAGE-Klon** (ID:6718236)

Invitrogen, Groningen, NL

Der IMAGE-Klon enthält einen pCMV-Sport Vektor mit inserierter humaner TFPI-2-cDNA.

## 6.5. Patienten- und Vergleichskollektive

### juvenile Apoplexpatienten

Klinik für Neurologie, Klinikum Minden, Minden, D

Die Plasmid-DNA von 41 Patienten (Durchschnittsalter 38 Jahre, S.D. 10,2; 16 Männer, 25 Frauen) nach ischämischen Schlaganfall ist molekulargenetisch nach Standardprotokollen, im Rahmen der allgemeinen Labordiagnostik, auf Risikofaktoren für venöse Thrombose und Myokardinfarkt untersucht worden. Die Definition des Krankheitsbildes ist nach den Kriterien der *World Health Organization* erstellt worden (Hatano, 1976).

### Blutspender

Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, D

Von 140 anonymisierten Blutspendern (Durchschnittsalter 38 Jahre, S.D. 11,7; 95 Männer, 45 Frauen) ist Plasmid-DNA aus EDTA-Vollblut isoliert und untersucht worden.

### Patienten nach *Stent*-Implantation

Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, D

Von 108 Patienten (Durchschnittsalter 64 Jahre, S.D. 8,8; 94 Männer, 14 Frauen) nach *Stent*-Implantation ist aus EDTA-Vollblut Plasmid-DNA isoliert und molekulargenetisch nach Standardprotokollen, im Rahmen der allgemeinen Labordiagnostik, auf Risikofaktoren für Myokardinfarkt und Restenose untersucht worden.

## 6.6. Längen- und Größenstandards

### DNA-Standard

DNA-Längenstandard	Fragmentgröße (bp)
<b>1 kB DNA-ladder</b> (Invitrogen, Groningen, NL)	12216, 11198, 10180,9162, 8144, 7216, 6108, 5090,4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
<b>pUC19/Mspl</b> (MBBL)	501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26

Tab. 6-1: DNA-Größenstandard mit dazugehörigen Fragmentgrößen.

**Proteinstandard****Mark 12 Wide Range Protein Standard** Novex, Groningen, NL**SeeBlue® Plus2 – PreStained Protein Standard** Invitrogen, Groningen, NL

Proteinbande	Tris-Glycin [kDa]	MOPS [kDa]
Myosin	250	191
Phosphorylase	148	97
Rinderserumalbumin	98	64
Glutamat-Dehydrogenase	64	51
Alkohol-Dehydrogenase	50	39
Carboanhydrase	36	28
Myoglobin Rot	22	19
Lysozyme	16	14
Aprotinin	6	n/a
Insulin, B-Kette	4	n/a

**Tab. 6-2:** Molekulargewicht der Proteinbanden des *SeeBlue® Plus2 – PreStained Protein Standard* in verschiedenen Puffersystemen.

**6.7. Oligonukleotide (Primer)**

Die für die PCR-Reaktionen und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen und sind nachfolgend aufgelistet.

**Primer für TFPI-1**

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Polymerase	AT (°C)
ges.TFPI <sub>up</sub>	CAA GAA CTT TCA TCA GAG A	<i>Ampli Taq</i>	54
ges.TFPI <sub>low</sub>	TTG CTA TAA CAA ATT CAC ATA		
MutP151L <sub>up</sub>	CAT TTG TGA AGA TGG TCT GAA TGG TTT CCA GGT G	<i>Pfu</i> Polymerase	55°C
MutP151L <sub>low</sub>	CAC CTG GAA ACC ATT CAG ACC ATC TTC ACA AAT G	<i>Pfu</i> Polymerase	55°C

**Tab. 6-3:** Primer für die Klonierung des TFPI-1-Gens in den pCR2.1-TOPO-Vektor und *site-directed* Mutagenese (536C>T).

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
M13Forward Primer (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
TFPI290forward	TGG AAG AGT GCA AAA AAA
TFPI583forward	AAT AAC TCC CTG ACT CCG
M13Reverse Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC
TFPI629reverse	ATG AGG GAC CGT GAA ATT
TFPI339reverse	TGT TGC AAT GTT GTC TTT

**Tab. 6-4:** Primer für die Sequenzierung des TFPI-1-Gens.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Polymerase	AT (°C)
MamTFPIHindIII	CGA AGC TTT GAT TCT GAG GAA GAT	<i>Ampli Taq</i>	48
MamTFPIXhol	TCC TCG AGC CAT ATT TTT AAC AAA		
InsTFPIHindIII	CTA AGC TTT GAT TCT GAG GA	<i>Ampli Taq</i>	48
InsTFPIXhol	ACC TCG AGA CAT ATT TTT AAC AA		

**Tab. 6-5:** Primer für die Klonierung des TFPI-1-Gens in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
T7Promoter	TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
pcDNA3.1/BGHreverse	CCT CGA CTG TGC CTT CTA
OpIE2Forward	CGC AAC GAT CTG GTA AAC AC
OpIE2Reverse	CTG ACT AAA TCT TAG TTT GTA TTG TC

**Tab. 6-6:** Primer für die Sequenzierung des klonierten TFPI-1-Gens

### Primer für TFPI-2

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Polymerase	AT (°C)
MamTFPI-2BamHI	CTCGGATCCAGATGCTGCTCAG	<i>HotstarTaq</i>	50
MamTFPI-2XhoI	TCCTCGAGAAAATTGCTTCTTCCG		
InsTFPI-2BamHI	TCGGATCCCGATGCTGCTCAG	<i>HotstarTaq</i>	50
InsTFPI-2XhoI	ACCTCGAGAAAATTGCTTCTTCCG		

**Tab. 6-7:** Primer für die Klonierung des TFPI-2-Gens in die Expressionsvektoren pSecTag2/HygroA und pMIB-V5-HisC.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
T7 Promoter	TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
tfpi2Seq290up	GCAACGCCAACAATTTCTAC
tfpi2Seq581up	CTGCCAATGTGACTCGCTAT
pcDNA3.1/BGH reverse	CCT CGA CTG TGC CTT CTA
tfpi2Seq290lo	GTAGAAATTGTTGGCGTTGC
tfpi2Seq581lo	ATAGCGAGTCACATTGGCAG
OpIE2 Forward	CGC AAC GAT CTG GTA AAC AC
OpIE2 Reverse	CTG ACT AAA TCT TAG TTT GTA TTG TC

**Tab.6-8:** Primer für die Sequenzierung des klonierten TFPI-2-Gens.

### Primer für das TFPI-2-Promotorfragment

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Polymerase	AT (°C)
TFPI-2P4032U	GCTAGTCTCGAACTCCTGAT	<i>HotstarTaq</i>	58°C
TFPI-2P4787L	AAAAGCAGCAGAATCGAC		

**Tab. 6-9:** Primer für die Klonierung des TFPI-2-Promotorfragments in den Vektor pCR2.1 TOPO.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Polymerase	AT (°C)
TFPI-2PXhol	GTCTCGAGCTCCTGATTTTCAGGT	<i>HotstarTaq</i>	60°C
TFPI-2PNrul	ATTCGCGAGGCCCGCTGGGCA		

**Tab. 6-10:** Primer für die Klonierung des TFPI-2-Promotorfragments in den pSEAP2-Basic-Vektor.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
TFPI-2P2SeqU	CTGAAGGTCCATTGCAAC
TFPI-2P3SeqU	CTTACACAGTTTGCAGCG
M13Forward	GTAAAACGACGGCCAG
TFPI-2P3SeqL	CTGAGGGGTGGCTGATTC
TFPI-2P2SeqL	TGGAGAGAAAGTGCGGAG
pSEAP 4600U	CAAAACGAAACAAAACAA
pSEAP 98L	CAGCAGCAGCAGCAGCAT

**Tab. 6-11:** Primer für die Sequenzierung des klonierten TFPI-2-Promotorfragments.

Mutation	Primer Sequenz 5'→3'
- 18C >A	GCCCAGCGGGC <u>A</u> TCGCGAATTCGCC GGCGAATTCGCGA <u>T</u> GCCCGCTGGGC
- 47C>A	CCTCCCGCCAGG <u>A</u> GCTTTCTCGGACG CGTCCGAGAAAGC <u>T</u> CCTGGCGGGAGG
-161G>C	GTCCCCGTGCAT <u>C</u> AATCAGCCACCCC GGGGTGGCTGATT <u>G</u> ATGCACGGGGAC
- 167G >A	GGGTGACAGTCCCC <u>A</u> TGCATGAATCAGCCA TGGCTGATTCATGCA <u>T</u> GGGGACTGTCACCC
- 353A >G	GCTTCTTTACAGCGCAG <u>T</u> CACTAGCAGGTCATTT AAATGACCTGCTAGTG <u>A</u> CTGCGCTGTAAAGAAGC
- 546 T>C	GCCTGTATTAATGTAA <u>A</u> CTAGAACTCGATTGAAATCTG CACAGATTTCAATCGAGT <u>T</u> CTAGTTTACATTTAATACAG
- 567 T>C	CACCTACGATATATT <u>A</u> CAAGCCTGTATTAATGTAAATTAG CTAATTTACATTTAATACAGGCTT <u>G</u> TAATATATCGTAGG

Tab. 6-12: Primer für die Mutagenese des TFPI-2-Promotorfragments. Der Einzelnukleotidaustausch ist unterstrichen.

## 6.8. DHPLC-Analyseparameter

### TFPI-1

Primer	Sequenz 5'→3'	Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)	Ofentemperatur (°C)	Start/Stop Konzentration von Puffer B (%)
1F 1R	AGGAAGTTGGGCTAT CTTATGGGCTAGACAGTA	341	58	56 58	58/66 60/68
3F 3R	TCTGTAAATGAGTGCATATTAACA TCCACAATGGAAAACCTATGG	270	63	57 60	51/59 48/56
4 F 4 R	AGTGTGATGGAGATTAC AGACTCAATAGCCTAAAG	279	48	57	55/63
5 F 5R	TTATAAATGGTGACAATGATATGC AGGGACCAGAAAAACAAC	179	60	55.2 55.9	52/60 52/60
6F 6R	AATATTGCTTTCTGACAT GATGCCTATAAATGAAC	253	48	56	54/62
7F 7R	ATGAGTCCAAATATGAGATTGTG GGAAGCAATAAAATCCACAAG	185	65	56 59 61	50/58 49/57 47/55
8F 8R	ATGGCTTACCATGTTTTCT AACACTAGTCCATTAATGGGAGAG	248	59	57.4 59 61	53/61 51/59 59/57
9F 9R	TTTAAATCAATAACATCTTTTGG TGATAACAAGTACAATAAGCATAGA	362	58	51.6 54.3	57/65 55/63

Tab. 6-13: Primer-Sequenzen, PCR-Bedingungen und DHPLC-Parameter für die Analyse des TFPI-1-Gens.

## TFPI-2

Primer	Sequenz 5'→3'	Produkt- größe (bp)	Annealing- temperatur (°C)	Ofen- temperatur (°C)	Start/Stop Konzentration von Puffer B (%)
1F 1R	ACAGTCCCCGTGCATGAATC GGCAGGGACCTGGAGAAA	373 bp	59	65.5 67.8	61/69 56/64
2F 2R	CCGCTCGGAAGGGGACA AGCGAGACGTGGGAAACTGG	368	61	62.4 63.3	57/65 57/65
3F 3R	GATTCATGGGAGTATTCTGG GAAATCATGAAAATGCACAT	438	53	57.5 58.5 61.5	58/66 58/66 55/63
4 F 4 R	GAGGCTTCTATGGGATTA CTGATTAACACTACGGAGAT	420	51	52.6 57.7	58/66 55/63
5 F 5R	TGAGCCTACAGACTGGAGA TTGTTAATCTGCGACTTTGT	581	48	53.5 54.2 57	64/72 62/70 56/64

**Tab. 6-14:** Primer-Sequenzen, PCR-Bedingungen und DHPLC-Parameter für die Analyse des TFPI-2-Gens.

## TFPI-2-Promotorfragment

Primer	Sequenz 5'→3'	Produkt- größe (bp)	Annealing- temperatur (°C)	Ofen- temperatur (°C)	Start/Stop Konzentration von Puffer B (%)
1PF 1PR	GCTAGTCTCGAACTCCTGAT CGTTGCAATGGACCTTC	268	55.8	53.5 56.6 64.4	55/63 53/61 48/56
2PF 2PR	AAACTGTCCACCTACGAT GGAGCGTTTGTGTCAG	298	53.4	53 60 62	57/65 54/62 50/58
3PF 3PR	AGCGCAATCACTAGCAG AAAAGCAGCAGAATCGAC	403	56.0	61.4 66.8 68.2	60/68 54/62 54/62

**Tab.6-15:** Primer-Sequenzen, PCR-Bedingungen and DHPLC-Parameter für die Analyse des TFPI-2-Promotorfragments.

## 6.9. Chemikalien und Reagenzien

<i>Actin FS Activated PTT Reagent</i>	Dade Behring, Deerfield, IL, USA
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen, D
Aqua Braun	B. Braun, Melsungen, D
Acetonitril, <i>HPLC-Gradient Grade</i>	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Anti-His (C-term)	Invitrogen, Groningen, NL
Anti-V5-HRP Antikörper	Invitrogen, Groningen, NL
AmpliTaq, FS Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt, D
Bis-Tris-PAA-Gele	Invitrogen, Groningen, NL
Blasticidin	Invitrogen, Groningen, NL
CELLFectin Transfektionsreagenz	Gibco BRL, Eggenstein, D
Chymotrypsin	Sigma, St. Louis, USA
Citronensäure	Merck, Darmstadt, D
4-Chloro-1-naphthol	Merck, Darmstadt, D
Coomassie R250	Sigma, St. Louis, USA
Chromogenes Substrat S-2586 für Chymotrypsin	Coachrom Diagnostica, Wien, A
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
dNTP	Promega, Mannheim, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Ethanol	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Ethidiumbromid (500 µg/ml)	Sigma, St. Louis, USA
<i>Fire Pol I Polymerase</i>	Solis Biotec, Estland
<i>Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent</i>	Roche, Mannheim, D
Gentamycin	Invitrogen, San Diego, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
<i>HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase</i>	Qiagen, Hilden, D
<i>Hot Fire Pol I Polymerase</i>	Solis Biotec, Estland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, St. Louis, USA
ImmobilonP-Membran	Millipore, Billerica, MA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D

Na-Citrat	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
MetaPhor <sup>®</sup> agarose	Bio-Whittaker, Walkersville, MD, USA
Methanol	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Mineralöl	Sigma, St. Louis, USA
NuPAGE <sup>®</sup> Antioxidanz	Invitrogen, Groningen, NL
NuPAGE <sup>®</sup> LDS- <i>Sample Buffer</i>	Invitrogen, Groningen, NL
NuPAGE <sup>®</sup> <i>Reducing Agent</i>	Invitrogen, Groningen, NL
NuPAGE <sup>®</sup> Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Groningen, NL
Transferpuffer (10x)	Anamed, Darmstadt-Arheilgen, D
NuPAGE <sup>®</sup> Tris-Glycin-SDS- Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Groningen, NL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
PBS	Invitrogen, Groningen, NL
Pepton aus Fleisch	Merck, Darmstadt, D
Plasmin	Sigma, St. Louis, USA
PVDF-Membran	Invitrogen, Groningen, NL
T4-Ligase und 10x Puffer	Promega, Mannheim, D
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x)	Gibco BRL, Eggenstein, D
PVDF-Membran	Invitrogen, Groningen, NL
<i>Rotisolv<sup>®</sup> HPLC-Gradient-Grade</i>	Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA
TrasyloI (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen, D
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Tris	Merck, Darmstadt, D
Tris-Glycin-PAA Gele	Anamed, Darmstadt-Arheilgen, D
Trypan-Blau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	ICN, Biomedicals
Tween 20	Sigma, St. Louis, USA
Vivaspin	Vivascience, Hannover, D
X-Gal	Gibco BRL, Eggenstein, D

Alle Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad (pro analysis, p.A.) bezogen.

## 6.10. Reagenziensätze

<i>ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
<i>Actichrome TFPI Activity Assay</i>	American Diagnostica, Stamford, CT, USA
<i>BD Great EscAPE™ SEAP Reporter System 3</i>	BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA
<i>BD Great EscAPE™ SEAP Chemiluminescence and Fluorescence Detection Kit</i>	American Diagnostica, Stamford, CT, USA
<i>High Speed Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen , Hilden, D
<i>Imubind Total TFPI ELISA Kit</i>	
<i>Micro Bio-Spin® P-30 Tris Chromatography Columns</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
<i>pMIB-V5-His A, B, and C Vector Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>pSecTag2/Hygro A, B, and C Vector Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>QIAamp® DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, D
<i>QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit</i>	Qiagen , Hilden, D
<i>QIAprep Spin Plasmid Kit</i>	Qiagen , Hilden, D
<i>QIAquick® PCR Purification Kit</i>	Qiagen , Hilden, D
<i>QIAshredder Homogenizers</i>	Qiagen , Hilden, D
<i>QuikChange XL</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, D
<i>TOPO-TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL

## 6.11. Puffer und Lösungen

### Auftragspuffer:

0,05 % Xylencyanol, 0,05 % Bromphenolblau, 60 % Saccharose in H<sub>2</sub>O

### Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0:

0,1 M Citronensäure, 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

### Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung:

1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in Entfärberlösung, filtriert

Entfärberlösung:

10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % Aqua B.

PBST, pH 7,4:

0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, 0,5 ml/l Tween20

Substratlösung:

1 ml 4-Chloro-1-Naphthol (3 mg/ml in Methanol), 5 ml Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0, 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

Tris/HCl-Puffer 0,1 M, pH 7,2**6.12. Sonstige Materialien**

Sterile Einweg-Plastikwaren, u.a. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Zellkulturschalen, wurden von den Firmen Becton Dickinson, Sarstedt, Sartorius, ABgene und Nerbe plus bezogen.

**6.13. Geräte**

Elektrophorese-Kammer	B1A; B2	AGS, Heidelberg, D
Autoklav	FNR3200 F	Tecnomera, Fernwald, D
ABI Prism	310 <i>Genetic Analyzer</i>	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
<i>Wavesystem</i>		Transgenomic, Omaha, NE, USA
ELISA-Reader	Tecan GENios	Tecan Männedorf, CH
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikrowellengerät	AEG Micromat	AEG, Dormagen, D
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Berlin, D
Photometer	Ultrospec 4050	LKB Biochrom, Cambridge, UK
Schüttler	<i>Celloshaker</i>	Renner GmbH, Darmstadt, D
Spannungsquellen	PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein, D
	PS 500	Renner GmbH, Darmstadt, D
Sterilbank	Mobilen W90	Variolab, Wangen, D
<i>Thermocycler</i>	Biometra	Göttingen, D
	Landgraf TCV	Landgraf, Langenhagen, D
Transilluminator		Renner GmbH, Darmstadt, D

---

Schüttler	Vortex Genie 2	Heidolph, Schwabach, D
Waage	LG10-D	Satorius, Göttingen, D
Wasserbad	B3	Haake, Karlsruhe, D
Zentrifugen	Biofuge 13	Heraeus Sepatec, Hanau, D
	Rotixal RP	Hettich, Tuttlingen, D

### **6.14. Software und Datenbanken**

Chromas 1.55	<a href="http://www.technelysium.com/chromas/html">www.technelysium.com/chromas/html</a>
Clone Manager 4.01	Scientific & Educational Software
Seqman 3.03	DNASTar, Inc.
Sequenz Analysis 3.7	Perkin Elmer
Wavemaker 4.1.42	Transgenomic
Transfac 4.0	<a href="http://cbil.upenn.edu/tess">http://cbil.upenn.edu/tess</a>
Entrez (PubMed/GenBank)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html</a>
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim</a>

## 7 Abkürzungen

VII	Faktor VII
VIIa	aktivierter Faktor VII
VIII	Faktor VIII
VIIIa	aktivierter Faktor VIII
IX	Faktor IX
IXa	aktivierter Faktor IX
X	Faktor X
Xa	aktivierter Faktor X
XI	Faktor XI
XIa	aktivierter Faktor XI
XII	Faktor XII
XIIa	Aktivierter Faktor XII
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bidest.	Zweifach destilliert
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>Copy-DNA</i>
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DHPLC	Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatografie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dPTT	<i>diluted thromboplastin time</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid

---

EtOH	Ethanol
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
m	Milli
M	Molar
$\mu$	Mikro
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mA	Milliampère
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimol
mV	Millivolt
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	Nano
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 <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease

rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
rWT-TFPI-1	rekombinanter Wildtyp <i>Tissue factor pathway inhibitor-1</i>
rWT-TFPI-2	rekombinanter Wildtyp <i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>
r[P151L]TFPI-1	rekombinante <i>Tissue factor pathway inhibitor -1</i> -Mutante
s	Sekunde
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	<i>secreted alkaline phosphatase</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI-1	<i>Tissue factor pathway inhibitor-1</i>
TFPI-2	<i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Thymintriphosphat
<i>Tween</i>	Polyethoxysorbitanlaurat
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	<i>very-low-density Lipoprotein</i>
WT	Wildtyp
WT-TFPI-2-PF	Wildtyp- <i>Tissue factor pathway inhibitor-2</i> -Promotorfragment
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

### Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin

H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

#### **Abkürzungen für DNA-Basen**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## 8 Literatur

Ameziane N, Seguin C, Borgel D, Fumeron F, Moatti D, Alhenc-Gelas M, Grandchamp B, Aiach M, Emmerich J, de Prost D. The -33T→C polymorphism in intron 7 of the TFPI gene influences the risk of venous thromboembolism, independently of the factor V Leiden and prothrombin mutations. *Thromb Haemost.* 2002; 88:195-199.

Amini-Nekoo A, Futers TS; Moia M, Mannucci PM, Grant PJ, Arlens RA. Analysis of the tissue factor pathway inhibitor gene and antigen levels in relation to venous thrombosis. *Brit J Haematol.* 2001; 113:537-543.

Arnaud E, Moatti D, Emmerich J, Aiach M, de Prost D. No link between the TFPI V264M mutation and venous thromboembolic disease. *Thromb Haemost.* 1999; 82:159-160.

Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP. Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: Evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Sci USA.* 1990; 87:8869-8873.

Barret AJ. Classification of peptidases. *Meth Enzymol.* 1994; 244:1-15.

Baugh RJ, Broze GJ Jr, Kirshnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem.* 1998; 273:4378-4386.

Belaouaj A, Li A, Wun TC, Welgus HG, Shapiro AD. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor: effect on coagulation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27123-27128.

Birnboim HC & Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res.* 1979; 7:1513.

Blindt R, Vogt F, Lamby D, Zeiffer U, Krott N, Hilger-Eversheim K, Hanrath P, vom Dahl J, Bosserhoff A-K. Characterization of differential gene expression in quiescent and invasive human arterial smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2002; 39:340-352.

Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem.* 1992; 204:433-451.

Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 1992; 11:327-333.

Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, TjianR. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science.* 1986; 234(4772):47-52.

Brinkmann T, Kaehnert H, Prohaska W, Nordfang O, Kleesiek K. 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.* 1994; 32(4):313-317.

Brodin E, Borvik T, Sandset PM, Bonna KH, Nordoy A, Hansen J-B. Coagulation activation in young survivors of myocardial infarction (MI) -a population-based case-control study. *Thromb Haemost.* 2004; 92:178-184.

Broze GJ Jr, Miletich JP. Isolation of tissue factor inhibitor produced by HepG2 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:1886-1890.

- Broze Jr. GJ, Lange GW, Duffin KL, MacPhail L. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994; 5:551-559.
- Broze Jr. GJ. The rediscovery and isolation of TFPI. *J Thromb Haemost*. 2003; 1:1671-1675.
- Busso N, Morard C, Salvi R, Peclat V, So A. Role of the tissue factor pathway inhibitor in synovial inflammation. *Arthritis Rheum*. 2003; 48: 651-659.
- Bützow R, Alfthan H, Stenman UH, Suikkari AM, Bohn H, Seppälä M. Immunofluometric demonstration and quantification on placental protein 5 in the absence of pregnancy. *Clin Chem*. 1988; 1591-1593.
- Bützow R, Huhtala M-L, Bohn H, Virtanen I, Seppälä M. Purification and characterization of placental protein 5. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 150:483-490.
- Bützow R, Virtanen I, Seppälä M, Närvänen O, Stenman UH, Ristimäki A, Bohn H. Monoclonal antibodies reacting with placental protein 5: use in radioimmunoassay, Western blot analysis, and immunohistochemistry. *J Lab Clin Med*. 1988; 111:249-256.
- Chand HS, Du X, Ma D, Inzunza HD, Kamei S, Foster D, Brodie S, Kiesel W. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice. *Blood*. 2003;
- Chang JY, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. TFPI $\beta$ , a second product from the mouse tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene. *Thromb Haemost*. 1999; 81:45-49.
- Crawley JTB, Goulding DA, Ferreira V, Severs NJ, Lupu F. Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:218-224.
- Dahm A, van Hylckama Vlieg A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood*. 2003; 101:4387-4391.
- Davie RW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964; 145: 1310-1312.
- Duerig C, Kosch A, Langer C, Thedieck S, Nowak-Göttl U. Total tissue factor pathway inhibitor is an independent risk factor for symptomatic paediatric venous thromboembolism and stroke. *Thromb Haemost*. 2004; 92:707-712.
- Enjyoji KI, Emi M, Mukai T, Imada M, Leppert ML, Lalouel JM, Kato H. Human tissue factor pathway (TFPI) gene: complete genomic structure and localization on the genetic map of chromosome 2q. *Genomics*. 1993; 17:423-428.
- Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92:1851-1855.
- Evans GD, Langdown J, Brown K, Baglin TP. The C536T transition in the tissue factor pathway inhibitor gene is not a common cause of venous thromboembolic disease in the UK population. *Thromb Haemost*. 2000; 83:511.

Girard TJ, Eddy R, Wesselschmidt RL, MacPhail LA, Likert KM, Byers MG, Shows TB, Broze GJ Jr. Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene: intron/exon gene organization and localization of the gene to chromosome 2. *J Biol Chem.* 1991; 266:5036-5041.

Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, Manzota F, Mazzucco A, Bernari F, Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *New Eng J Med.* 2000; 343:774-780.

Golino P, Ravera A, Ragni M, Cirillo P, Piro O, Chiariello M. Involvement of tissue factor pathway inhibitor in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003; 108:2864-2869.

Gonzales-Conejero R, Lozano ML, Corral J, Martinez C, Vicente V. The TFPI 536 C→T mutation is not associated with increased risk for venous or arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000; 83:787-788.

Hamik A, Setiadi H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH. Down-regulation of monocyte tissue factor-mediated by TFPI and LRP. *J Biol Chem.* 1999; 274:4962-4969.

Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ.* 1976; 54:541-543.

Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schönbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107:1117-1126.

Hessner MJ, Luhm RA. The C535T transition in the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) does not contribute to risk of venous thrombosis among carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 2000; 84:724-725.

<http://www.who.int>.

Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Cherpi-Antar C, Gruel Y. Characterization and functional analysis of TFPI-2 gene promoter in human choriocarcinoma cell line. *Thromb Res.* 2003; 109:207-215.

Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y. Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biol Chem.* 2003; 384:1029-1034.

Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Trassard S, Thibault G, Gruel Y. Demonstration of a tissue factor pathway inhibitor 2 messenger RNA synthesis by pure villous cytotrophoblast cells isolated from term human placentas. *Biol Reproduc.* 2003; 68:1888-1894.

Iakhiaev A, Pendurthi UR, Voigt J, Ezban M, Rao LVM. Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem.* 1999; 274:36995-37003.

Iino M, Foster DC, Kisiel W. Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:40-46.

Iversen N, Indahl AK, Abildgaard U. Elevated Plasma levels on the factor Xa-TFPI complex in cancer patients. *Thromb Res.* 2002; 105:33-36.

- Junker R, Glahn J, Tidow N, Brinkmann T, Nabavi DG. The tissue factor pathway inhibitor C536T mutation is not associated with the risk of stroke in young adults. *Thromb Haemost.* 2002; 87:920-921.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 1987; 51(6):1079-1090.
- Kadonaga JT, Currey AJ, Ladika J, Tjian R. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science.* 1988; 242(4885):1566-1570.
- Kamei S; Kazama Y, Kuijper JL, Foster DC, Kisiel W. Genomic structure and promoter activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 gene. *Biochem Biophys Acta.* 2001; 1517:430-435.
- Kamei S, Petersen LC, Sprecher CA, Forster DC, Kisiel W. Inhibitory Properties of human recombinant Arg<sup>24</sup>→Gln Type-2 tissue factor pathway inhibitor (R24Q TFPI-2). *Thromb Res.* 1999; 94:147-152.
- Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor. Basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:539-548.
- Kawasaki ES (1991). Amplification of RNA. In: PCR-protocols, a guide to methods and applications (Innis, MA, Gelfand, DH, Sninsky, JJ & White, T J, Eds.) Academic Press, San Diego, USA.
- Kisiel W, Sprecher CA, Foster DC. Evidence that a second human tissue factor pathway inhibitor (TFPI-2) and human placental protein 5 are equivalent. *Blood.* 1994; 84:4384-4385.
- Kleesiek K, Schmidt M, Götting C, Brinkmann T, Prohaska W. A first mutation in the human tissue factor pathway inhibitor gene encoding [P151L]TFPI. *Blood.* 1998; 92:3976-977.
- Kleesiek K, Schmidt M, Götting C, Schwenz B, Lange S, Müller-Berghaus G, Brinkmann T, Prohaska W. The 536C→T transition in the human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene is statistically associated with a higher risk for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82:1-5.
- Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to the octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell.* 1994; 77:21-32.
- Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci.* 2003; 104:493-501.
- Konduri SD, Rao CN, Chandrasekar N, Tasiou A, Mohanam S, Kin Y, Lakka SS, Dinh D, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Rao JS. A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion. *Oncogene.* 2001; 20:6938-6945.
- Konduri SD, Srivenugopal KS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Ali-Osman F, Kondraganti S, Lakka SS, Rao JS. Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), in human glioma cells. *Oncogene.* 2003; 22:4509-4516.
- Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Rao JS. Over-expression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decrease the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol.* 2001; 18:127-131.

- Konduri SD, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero W, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Rao JS. Physiological and chemical inducers of tissue factor pathway inhibitor-2 in human glioma cells. *Int J Oncol*. 2003; 22:1277-1283
- Kunicki TJ, Pidard D, Cazenave JP, Nurden AT, Caen JP. Inheritance of the human platelet alloantigen PIA1, in type I Glanzmann's thrombastenia. *J Clin Invest*. 1981; 67: 717-724.
- Lakka SS, Konduri SD, Mohanam S, Nicolson GL, Rao JS. In vitro modulation of human lung cancer cell line invasiveness by antisense cDNA of tissue factor pathway inhibitor 2. *Clin Exp Metstasis*. 2000; 18:239-244.
- Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem*. 1980; 49:593-626.
- Leurs PB, vanOerle K, Wolfenbuttel BHR. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) release after heparin stimulation is increased in Type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabet Med*. 2003; 20:16-22.
- Li A, Wun TC. Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin: effect on TFPI activity. *Thromb Haemost*. 1998; 80:423-427.
- MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964; 202:498-499.
- März W, Boehm BO, Winkelmann, Hoffmann MM. The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with a risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Diabetologia*. 2004; 47(11):1969-1973.
- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:152-156.
- Mast AE, Higuchi DA, Huang ZF, Warshawsky I, Schwartz AL. Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J*. 1997; 327:577-583.
- Mast AE, Stadanick JE, Lockett JM, Dietzen DJ, Hasty KA, Hall CL. Tissue factor pathway inhibitor binds to platelet thrombospondin-1. *J Biol Chem*. 2000; 275:31715-31721.
- McGee MP, Foster S, Wang X. Simultaneous expression of tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *J Exp Med*. 1994; 179:1847-1854.
- Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Akoi I, Misugi K, Umeda M, Miyazaki K. cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem*. 1994; 116:939-942.
- Miyagi Y, Yasumitsu H, Eki T, Miyata S, Koshikawa N, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Miyazaki K. Assignment of the human PP5/TFPI-2 gene to 7q22 by FISH and PCR-based human/rodent cell hybrid mapping panel analysis. *Genomics*. 1996; 35: 267-268.

- Miyata T, Sakata T, Kumeda K, Uchida K, Tsushima M, Fujimura H, Kawasaki T, Kato H. C-399T polymorphism in the promoter 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.* 1998; 80:345-6.
- Moatti D, Haidar B, Fumeron F, Gauci L, Boudvillain O, Seknadji P, Oliver V, Aumont MC, de Prost D. A new T-287C polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor pathway inhibitor gene. Association study of the T-287C and C-399T polymorphism with coronary artery disease and plasma TFPI levels. *Thromb Haemost.* 2000; 84:244-9.
- Moatti D, Meirhaege Ollivier V, Bauters C, Amouyel P, de Prost D. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor gene and the risk of restenosis after coronary angioplasty. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001; 12:317-323.
- Moatti D, Seknadji P, Galand C, Poirier O, Fumeron F, Desprez S, Garbarz M, Dhermy D, Arveiler D, Evans A, Luc G, Ruidavets JB, Oliver V, Hakim J, Aumont MC, de Prost D. 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.* 1999; 19:862-869.
- Mues GI, Sarode R. Allele frequencies of tissue factor pathway inhibitor polymorphisms in African-American, Hispanic and Caucasian populations. *Thromb Haemost.* 2002; 88:875-7.
- Newman PJ, Seligsohn U, Lyman S, Collier BS. The human platelet alloantigens, PI(A1) and PI(A2), are associated with a leucine(33)/proline(33) amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest.* 1989; 83:1778-1781.
- Nishiuma S, Kario K, Yakushijiin K, Maeda M, Murai R, Matsuo T, Shimada K, Matsuo M. Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998; 373-379.
- Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJ Jr. Plasma antigen levels of lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood.* 1991; 78:387-393.
- Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1988; 72:2020-2025.
- Ohkura N, Enyoji K, Kamikubo Y, Kato K. A novel degradation pathway of tissue factor pathway inhibitor: incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin. *Blood.* 1997; 90:1883-1892.
- Pedersen AH, Nordfang O, Norris F, Wiberg FC, Christensen M, Moeller KB, Meidahl-Pedersen J, Beck TC, Norris K, Hedner U, Kisiel W. Recombinant human extrinsic pathway inhibitor. *J Biol Chem.* 1990; 265:16786-16793.
- Peerschke EIB, Petrovan RJ, Ghebrehiwet B, Ruf W. Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) recognizes the complement and kininogen binding protein gC1qR/p33 (gC1qR): implications for vascular inflammation. *Thromb Haemost.* 2004; 92:811-819.
- Peterson LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel Kunitz-Typ protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry.* 1996; 35: 266-272.
- Petit L, Lesnik P, Datchet C. The promoter of human tissue factor pathway inhibitor gene: identification of potential regulatory elements. *Thromb Res.* 1999; 95:255-262.

- Phillips K, Luisi B. The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol.* 2000; 302: 1023-1039.
- Piro O, Broze Jr GJ. Role of Kunitz-3 domain of tissue factor pathway inhibitor-alpha in cell surface binding. *Circulation.* 2004; 110:3567-3572.
- Rao CN, Gomez DE, Woodley DT, Thorgeirsson UP. Partial characterization of novel serine proteinase inhibitors from human umbilical vein endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 319:55-62.
- Rao CN, Laka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, Rao JS. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:570-576.
- Rao CN, Liu YY, Peavey CL, Woodley DT. Novel extracellular matrix-associated serine proteinase inhibitors from human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 317:311-314.
- Rao CN, Mohanam S, Puppala A, Rao JS. Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 255:94-98.
- Rao CN, Peavey CL, Liu YY, Lapiere JC, Woodley DT. Partial characterization of matrix-associated serine protease inhibitors from human skin cells. *J Invest Dermatol.* 1995; 104:379-383.
- Rao CN, Reddy P, Reeder DJ, Liu Y, Stack SM, Kisiel W, Woodley DT. Procaryotic expression, purification, and reconstitution of biological activities (antiprotease, antitumor, and heparin-binding) for tissue factor pathway inhibitor-2. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2000; 276:1286-1294.
- Rideout WMI, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosin as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 1990; 249:1288-1290.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000; 21(3):461-467
- Ryan AK.; Rosenfeld MG. POU domain family values: flexibility, partnership, and developmental codes. *Genes Dev.* 1997, 11:1207-1225.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239:487-491.
- Salemink I, Franssen J, Willems GM, Hemker C, Li A, Wun TC, Lindhout T. Factor Xa cleavage of tissue factor pathway inhibitor is associated with loss of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 1998; 80:273-280.
- Sanger F, Nickler S & Coulson AR. DNA Sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; 74:5463-5467.
- Seppälä M, Rutanen EM, Siiteri JE, Wahlström T, Koistinen R, Pietilä T, Bohn H. Immunologic and biologic properties and clinical significance of placenta proteins PP5 and PP12. *Ann NY Acad Sci.* 1983; 417:368-382.

- Siegling S, Thyzel E, Brinkmann T, Prohaska W, Glahn J, Götting C, Kleesiek K. Genetic variations in the human TFPI-2 gene and its promoter region by denaturing high performance liquid chromatography. *Thromb Res.* 2004; 113(5):341-3.
- Siiteri JE, Koistinen R, Salem HAT, Bohn H, Seppala M. Placental protein 5 is related to blood coagulation and fibrinolytic systems. *Life Sci.* 1982; 30:1885-1891.
- Sprecher CA, Kisiel W, Mathewes S, Foster DC. Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway-inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:3353-3357.
- Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 1988; 2:1582-1599.
- Sytina EV, Pankratova EV. Transcription factor Oct-1: plasticity and multiplicity of function. *Molecular Biol.* 2003; 37:637-648.
- Tardy-Poncet B, Tardy B, Laporte S, Mismetti P, Amiral J, Piot M, Reynaud J, Campos L, Decousus H. Poor anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor in patients with venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:507-510.
- Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1992; 3:226-231.
- Thomas AE, Green FR, Kelleher HC, Wilkes PJ, Brennan PJ, Meade TW, Humphries SE. Variation in the promoter region of the  $\beta$ -fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb Haemost.* 1991; 65:487-490.
- Thyson DR, Kuppuswamy MN, Broze GJJ, Bajaj SP. Revised DNA sequence of exon 1 and 5' flanking region of the human tissue factor pathway inhibitor gene. *Thromb Res.* 1993; 70:269-273.
- Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455→A) in the  $\beta$ -fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. *J Clin Invest.* 1997; 99:3034-3039.
- Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima Y, Mianaguchi H, Misugi K, Yasumitsu H, Miyazaki K. Specific expression of PP5/TFPI-2 m-RNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. *Placenta.* 1998; 19:217-223.
- Van der Logt CPE, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial liposaccharide and phorbol ester. *Blood Coag Fibrinol.* 1994; 5:211-220.
- Van der Logt CPE, Kluck PMC, Wiegant J, Landegent, JE, Reitsma PH. Refined regional assignment of the human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene to chromosome band 2q32 by non-isotopic in situ hybridisation. *Hum Genet.* 1992; 89:577-578.
- Van der Logt CPE, Reitsma PH, Bertina RM. Intron-exon organization of the human gene coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor: The factor Xa dependent inhibitor of the extrinsic pathway of coagulation. *Biochemistry.* 1991; 30:1571-1577.
- Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:216-229.

Wang K, Koop BF & Hood L. A simple method using T4 DNA polymerase to clone polymerase chain reaction products. *Biotechniques*. 1994; 17:236-238.

Warn-Cramer BJ, Maki SL, Zivelin A, Rapaport SI. Partial purification and characterization of the extrinsic pathway inhibitor. *Thromb Res*. 1987;48:11-22.

Westin G, Schaffner W. Heavy metal ions in transcription factors from HeLa cells: Sp1, but not octamer transcription factor requires zinc for DNA binding and for activator function. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(13):5771-5781.

Wun T-C, Kretzmer K, Girard TJ, Miletich JP, Broze Jr GJ. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitor domains. *J Biol Chem*. 1988; 13:6001-6004.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001; 17(6):439-474.

Zhang J, Piro O, Lu L, Broze Jr GJ. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation*. 2003; 108(5):623-627.

## 9 Publikationen & Präsentationen

### Publikationen:

1. **Siegling S**, Thyzel E, Brinkmann T, Prohaska W, Glahn J, Götting C, Kleesiek K. Analysis of genetic variations in the human TFPI-2 gene and its promotor region in apoplectic patients and blood donors. J Thromb Thrombolysis. -submitted-
2. Thyzel E, **Siegling S**, Tinneberg HR, Götting C, Kleesiek K. Age dependant assessment of TFPI levels in follicular fluid of women undergoing IVF. Clinica Chimica Acta. -accepted-
3. **Siegling S**, Thyzel E, Brinkmann T, Prohaska W, Glahn J, Götting C, Kleesiek K. Genetic variations in the human TFPI-2 gene and its promoter region by denaturing high performance liquid chromatography. Thromb Res. 2004; 113(5):341-3.
4. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Tinneberg HR, Brinkmann T, Kleesiek K. Quantification of tissue factor pathway inhibitor in human seminal plasma and human follicular fluid. Thromb Res. 2003 Mar 15; 109(5-6):329-32.
5. Middendorf B, Blum-Oehler G, Dobrindt U, Mühldorfer I, **Salge S**, Hacker J. The pathogenicity islands (PAIs) of the uropathogenic Escherichia coli strain 536: island probing of PAI II536. J Infect Dis. 2001 Mar 1; 183 Suppl 1:17-21.

### Kongressvorträge:

1. **Siegling S**. TFPI-2 promoter: Analysis of sequence variations. 49. GTH-Jahrestagung, Mannheim, Februar 2005.
2. **Siegling S**. Detection of genetic variations in the human Tissue Factor Pathway Inhibitor -2 gene (TFPI-2) and its promoter region by DHPLC in apoplex patients. 48. GTH-Jahrestagung, Hamburg, Februar 2004.

### Publizierte Kongressbeiträge:

1. **Siegling S**, Thyzel E, Götting C, Kleesiek K. TFPI-2 promoter: Analysis of sequence variations. 49. GTH-Jahrestagung, Hämostaseologie 2005; V22.
2. Thyzel E, Kohli S, **Siegling S**, Götting C, Kleesiek K. Heparin-induced upregulation of TFPI mRNA expression in human endothelial cells in-vitro. 49. GTH-Jahrestagung. Hämostaseologie 2005; V20.
3. Thyzel E, **Siegling S**, Kohli S, Götting C, Kleesiek K. Determination of TFPI concentrations in liquor folliculi of OHSS patients during in-vitro fertilization. 49. GTH-Jahrestagung. Hämostaseologie 2005; P94.
4. Thyzel E, **Siegling S**, Kohli S, Götting C, Kleesiek K. Elevated Levels of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) in Women Suffering from Hyperhomocysteinemia. DGKL Congress Düsseldorf 2004. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2004; E13.

5. **Siegling S**, Thyzel E, Götting C, Kleesiek K. TFPI-2 Promoter Region: Detection of Sequence Variations by DHPLC. DGKL Congress Düsseldorf 2004. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2004; E01.
6. **Siegling S**, Thyzel E, Götting C, Kleesiek K. TFPI-2: First detection of sequence variations in the promoter region by denaturing high performance liquid chromatography. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena (2004).
7. **Siegling S**, Thyzel E, Götting C, Kleesiek K. Detection of genetic variations in the human Tissue Factor Pathway Inhibitor 2 gene (TFPI-2) and its promoter region by DHPLC in apoplex patients. 48. GTH-Jahrestagung, Hämostaseologie 2004; 24:A13.
8. Thyzel E, **Siegling S**, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Götting C, Kleesiek K. Decreased levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in plasma of women undergoing in-vitro fertilisation. 48. GTH-Jahrestagung, Hämostaseologie 2004; 24:A176.
9. Thyzel E, **Siegling S**, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Götting C, Kleesiek K. Quantification of Tissue factor Pathway inhibitor (TFPI) Levels in Human Reproductive Fluids. EUREGIO Congress Aachen 2003, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Vol. 41, No. 10, A124.
10. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. Quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human reproductive fluids. EUROMEDLAB 2003, 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1-5 June 2003.
11. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. Recombinant expression of wild type tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and the [P151L]TFPI mutant in insect and mammalian cells. EUROMEDLAB 2003, 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1-5 June 2003.
12. Brinkmann T, Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Tinneberg H-R & Kleesiek K. Decreased TFPI levels in seminal plasma of fertile men. AACC 2003, Annual Meeting and Clinical Lab Expo, July 20-24, 2003, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
13. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T & Kleesiek K. 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, Brinkmann T & Kleesiek K. 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.
15. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Tinneberg H-R, Brinkmann T & Kleesiek K. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Quantification in human seminal plasma and in human ovarian follicular fluid. 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Thrombosis and Haemostasis Research, Innsbruck, Austria, Feb. 2003. Annals of Hematology 82, Suppl. 1, 85 (2003).
16. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): Expression of wild type TFPI and the [P151]TFPI mutant in insect and mammalian cells. 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Thrombosis and Haemostasis Research, Innsbruck, Austria, Feb. 2003. Annals of Hematology 82, Suppl. 1, 85 (2003).  
-best abstract prize-

17. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. Quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in human seminal plasma and in human ovarian follicular fluid. Annual Meeting of the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, Germany, Nov. 2002. J Lab Med 26, 506 (2002).
18. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. Expression of wild type TFPI and the [P151L]TFPI mutant in insect and mammalian cells. Annual meeting of the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, Germany, Nov. 2002. J Lab Med 26, 506 (2002).
19. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. 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).
20. Thyzel E, **Siegling S**, Götting C, Brinkmann T & Kleesiek K. 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 Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Salzburg, Austria, Sep. 2002. Wiener Klinische Wochenschrift 114, Suppl. 4, 11 (2002).
21. **Siegling S**, Thyzel E, Brinkmann T, Götting C & Kleesiek K. Molecular cloning of TFPI mutants: First expression of [P151L] TFPI in insect cells. 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Society of Thrombosis and Haemostasis Research, Erfurt, Germany, Feb. 2002. Annals of Hematology 81, Suppl. 1. 1, 79 (2003).