

**Experimente zur Aktivierung von
Heparinkofaktor II durch
Heparin und Dermatansulfat
unter Verwendung eines
reversiblen molekularen Schalters**

von der
Technischen Fakultät der
Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

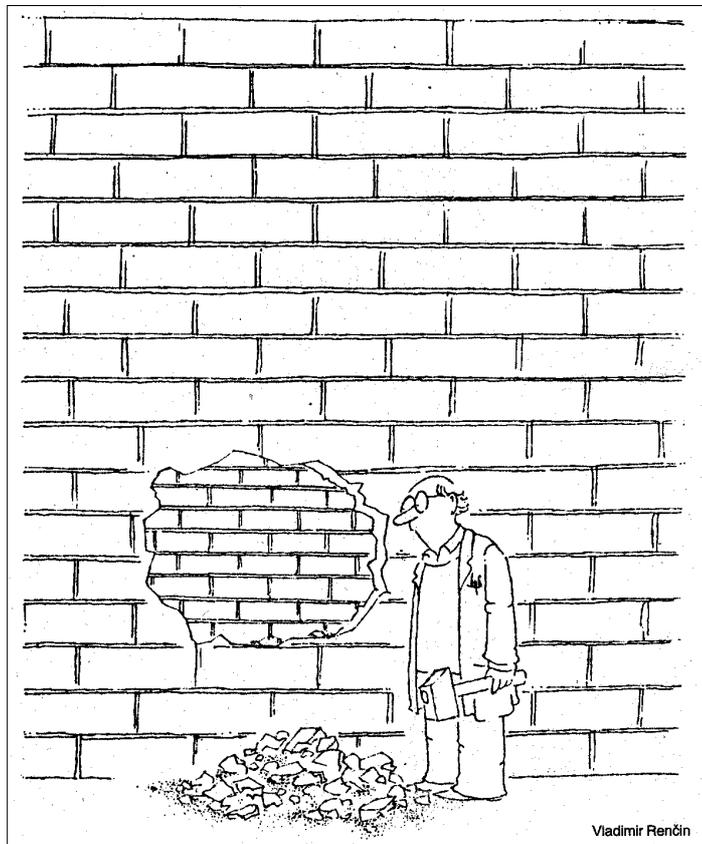
Dissertation

vorgelegt von

Dipl. - Biol. Stephan Brinkmeyer

aus Herford

2001



Vladimir Renčín

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	1
B Einleitung	3
B.1 Überblick und funktionelle Einordnung.....	3
B.2 Blutgerinnung und Haemostase.....	3
B.3 Serinproteasen.....	5
B.4 Serpine.....	7
B.4.1 Tertiärstrukturen von Serpinen.....	8
B.4.2 Inhibitionsmechanismus von Serpinen.....	10
B.4.3 Humanserpine und ihre medizinische Bedeutung.....	12
B.5 Heparinkofaktor II.....	13
B.5.1 HCII-Genstruktur und systematische Einordnung.....	15
B.5.2 HCII-Aktivierung durch Glykosaminoglykane.....	15
B.5.3 Physiologie.....	20
B.6 Glykosaminoglykane und Proteoglykane.....	23
C Zielsetzung der Arbeit	25
D Material & Methoden	27
D.1 Material.....	27
D.1.1 Geräte.....	27
D.1.2 Dokumentation.....	28
D.1.3 Kits.....	28
D.1.4 Enzyme.....	28
D.1.4.1 Restriktionsendonucleasen und Puffer.....	28
D.1.4.2 weitere Enzyme.....	29
D.1.5 DNA-Längenstandards.....	30
D.1.6 Proteingrößenmarker.....	31
D.1.7 Antibiotika.....	31
D.1.8 Primer.....	32
D.1.9 Bakterienstämme.....	33
D.1.10 Zelllinien.....	33
D.1.11 Antikörper.....	33
D.1.12 weitere Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	34
D.1.13 Software.....	35
D.1.14 Datenbanken.....	35
D.2 Methoden.....	36
D.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	36
D.2.1.1 Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen.....	36
D.2.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen.....	37
D.2.1.3 Transformation von Bakterienzellen.....	37
D.2.1.3.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
D.2.1.3.2 Transformation.....	38
D.2.2 Zellkulturmethoden.....	38
D.2.2.1 Medien und Lösungen für die Kultivierung tierischer Zellen.....	39
D.2.2.2 Passagieren von Zellen.....	40
D.2.2.3 Trypanblau-Ausschlußfärbung.....	40
D.2.2.4 Kryokonservierung.....	41

D.2.2.5	DAPI-Test auf Mycoplasmen	41
D.2.2.6	COS-Zell System	42
D.2.2.7	Transfektion von eukaryotischen Zellen	42
D.2.2.7.1	Transiente Lipofektion von COS7-Zellen	43
D.2.2.7.2	Elektroporation von COS7-Zellen zur transienten Produktion von rekombinalem HCII.....	44
D.2.2.8	CHO Zellsystem	45
D.2.2.8.1	Etablierung einer rekombinanten CHO DUKX B1 Zelllinie.....	46
D.2.3	Dreidimensionale Proteinmodellierungen	47
D.2.4	Genetische Methoden	48
D.2.4.1	Polymerase Kettenreaktion.....	48
D.2.4.1.1	Kolonie-PCR	51
D.2.4.2	PCR-Mutagenese	51
D.2.4.2.1	PCR-Mutagenese nach Picard <i>et al.</i>	52
D.2.4.2.2	PCR-Mutagenese durch Overlap-Extension-PCR.....	54
D.2.4.3	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	57
D.2.4.4	Reinigung von DNA.....	58
D.2.4.4.1	Isolation von DNA aus Agarosegelen mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit	58
D.2.4.4.2	Isolation von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	59
D.2.4.4.3	Isolation von Plasmid-DNA mittels Quantum Prep [®] Plasmid Miniprep Kit	59
D.2.4.4.4	Plasmid Maxi-Prep	59
D.2.4.4.5	Fällung von DNA	61
D.2.4.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	61
D.2.4.5.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	61
D.2.4.5.2	Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	62
D.2.4.6	Restriktionsspaltung von DNA.....	62
D.2.4.7	Dephosphorylierung von DNA.....	63
D.2.4.8	Sequenzierung von DNA.....	64
D.2.4.8.1	DNA-Sequenzierung mit dem DNA-Sequencer 1500.....	65
D.2.4.8.1.1	Sequenzierreaktionen.....	66
D.2.4.8.1.2	Gellauf mit GATC-Long Run System und Detektion	67
D.2.4.8.2	DNA-Sequenzierung mit dem Li-Cor DNA Sequencer 4000	67
D.2.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase	69
D.2.4.10	Konstruktion von Plasmiden	70
D.2.4.10.1	Subklonierung von PCR-Mutagenese-Produkten.....	72
D.2.4.10.1.1	Konstruktion des Plasmids pSBR1	73
D.2.4.10.1.2	Konstruktion des Plasmids pSBR3	73
D.2.4.10.1.3	Konstruktion des Plasmids pSBR4.....	74
D.2.4.10.2	Konstruktion von Expressionsplasmiden	75
D.2.4.10.2.1	Konstruktion des Plasmids pHCIIC273S/C323S	76
D.2.4.10.2.2	Konstruktion des Plasmids pHCIIDeltaC	77
D.2.4.10.2.3	Konstruktion des Plasmids pHCIIDeltaC F195C	78
D.2.4.10.2.4	Konstruktion des Plasmids pHCIIF195C	80
D.2.4.10.2.5	Konstruktion der Plasmide pHCIIDeltaC F195C/P52C, pHCIIDeltaC F195C/G54C und pHCIIDeltaC F195C/S68C	81
D.2.4.10.3	Konstruktion des Plasmids pSBR21	84
D.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	85
D.2.5.1	ELISA.....	85

D.2.5.2	Affinitätschromatographische Reinigung von HCII.....	88
D.2.5.2.1	Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose und linearem NaCl-Gradienten.....	89
D.2.5.2.2	Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose und NaCl-Stufengradienten	91
D.2.5.3	HCII-Konzentrierung und Umpufferung mit Mikrokonzentratoren.....	92
D.2.5.4	Bromcyanspaltung von HCII.....	92
D.2.5.5	Alkylierung von HCII.....	93
D.2.5.6	Bestimmung der DTT-Grenzkonzentration zur Reduktion der neu eingeführten Disulfidbrücke.....	95
D.2.5.7	Reoxidation von reduziertem HCII	96
D.2.5.8	HCII/Thrombin-Komplexierungen.....	97
D.2.5.8.1	HCII/Thrombin-Komplexierung mit bzw. ohne DTT-Zugabe.....	97
D.2.5.8.2	Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid	98
D.2.5.8.2.1	Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Anwesenheit von GAGs.....	99
D.2.5.8.2.2	Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Abwesenheit von GAGs.....	99
D.2.5.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	100
D.2.5.10	Western-Blot.....	101
D.2.5.11	Chemilumineszenz-Immundefektion.....	102
D.2.5.12	Quantitativer Western-Blot.....	103
D.2.5.13	Coomassieblau-Färbung	104
D.2.5.14	Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.....	104
E	Ergebnisse	107
E.1	Dreidimensionale Proteinmodellierungen	107
E.2	Konstruktion von Plasmiden	113
E.2.1	Konstruktion von Subklonen	113
E.2.1.1	Konstruktion von pSBR1.....	113
E.2.1.2	Konstruktion von pSBR3.....	114
E.2.1.3	Konstruktion von pSBR4	115
E.2.2	Konstruktion von Expressionsplasmiden	116
E.2.2.1	Konstruktion von pHCIIC F195C/G54C	119
E.3	Sequenzierungen.....	122
E.4	Produktion von rekombinantem HCII	127
E.4.1	Produktion von rekombinantem HCII in COS 7-Zellen nach transienter Lipofektion.....	127
E.4.2	Produktion von rekombinantem HCII in COS7-Zellen nach Elektroporation ..	128
E.4.3	Etablierung einer rekombinanten CHO DUKX B1 Zelllinie und Produktion von rekombinantem HCIIAC F195C/P52C.....	128
E.5	Nachweis des rekombinant hergestellten HCII	130
E.6	Partielle Reinigung von HCII mit Heparin-Sepharose	131
E.6.1	Partielle Reinigung von HCII aus COS7-Zellen mittels linearem NaCl-Gradienten.....	131
E.6.2	Partielle Reinigung von HCII aus CHO DUKX B1 Zellen mittels NaCl-Stufengradienten.....	133
E.7	Nachweis der neu ins HCII eingeführten Disulfidbrücken.....	134

E.7.1	Unterschiedliche Mobilität der Varianten unter nicht reduzierenden Bedingungen.....	134
E.7.2	Nachweis mittels Bromcyanspaltung	135
E.8	Test auf Dimerbildung.....	137
E.9	Bestimmung der minimalen DTT-Konzentration zur Reduktion der eingebauten Disulfidbrücke	139
E.10	HCII/Thrombin-Komplexierung in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat mit bzw. ohne DTT-Zugabe	139
E.11	Reoxidation von HCII Δ C F195C/P52C <i>in vitro</i>	141
E.12	Reduktion und Alkylierung von HCII-Varianten für kinetische Messungen.....	142
E.13	Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Anwesenheit von GAGs	142
E.14	Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Abwesenheit von GAGs	147
E.15	Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.....	148
F	Diskussion	151
F.1	Theoretische Vorüberlegungen zur Konstruktion einer Disulfidbrücke	151
F.2	Dreidimensionale Modellierungen von HCII.....	153
F.3	Genetische Arbeiten zur Erzeugung und Charakterisierung von rekombinanten HCII-Varianten.....	154
F.4	Produktion von rekombinanten HCII-Varianten in tierischen Zelllinien	155
F.5	Partielle Reinigung von HCII-Varianten	157
F.6	Strukturelle Charakterisierung von HCII-Varianten	159
F.6.1	Nachweis der neu ins HCII eingeführten Disulfidbrücken.....	159
F.6.2	Reoxidation von HCII Δ C F195C/P52C <i>in vitro</i>	160
F.6.3	Dimerbildung.....	161
F.7	Funktionelle Charakterisierung von HCII-Varianten	161
F.7.1	Die Rolle der natürlich vorkommenden Cysteine	161
F.7.2	HCII-Thrombin-Reaktion in der Abwesenheit von Glykosaminoglykanen.....	162
F.7.3	Qualitative Versuche zur Komplexbildung der HCII-Varianten mit Thrombin in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat.....	164
F.7.4	Semiquantitative Charakterisierung der HCII-Thrombin-Reaktion in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen	165
F.7.5	Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.....	167
F.8	Resumé	169
F.9	Ausblick.....	169
G	Literaturverzeichnis	171
H	Anhang	194
H.1	cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII.....	194
H.2	Abkürzungsverzeichnis	195
H.3	Aminosäuren und ihre Abkürzungen.....	197
H.4	Übersicht über untersuchte rekombinate HCII-Varianten.....	198
H.5	Veröffentlichungen.....	198
H.6	Bildungsweg	199
Danksagung.....		200
und schlußendlich.....		201

A Zusammenfassung

Heparinkofaktor II (HCII) gehört zu einer Gruppe von Proteinen, welche als Serpine (**Ser**-**P**rotease-**I**nhibitoren) bezeichnet werden. Seine biologische Funktion besteht in der Hemmung der Serinprotease Thrombin, einem Schlüsselenzym u.a. der Blutgerinnung unter Bildung von SDS-stabilen Komplexen im Verhältnis 1:1. In der Abwesenheit von Glycosaminoglycanen (GAGs) ist HCII ein ineffektiver Inhibitor von Thrombin. Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen HCII und Thrombin wird durch GAGs wie Heparin, und Dermatansulfat über 1000-fach beschleunigt.

Die Aktivierung von HCII durch GAGs erfolgt vermutlich durch einen allosterischen Mechanismus. Der Modellvorstellung nach reagiert HCII in der Abwesenheit von GAGs nur über sein, für einen Inhibitor von Thrombin eher ungeeignetes reaktives Zentrum mit Thrombin. Die Hemmung von Thrombin erfolgt dabei nur mit geringer Reaktionsgeschwindigkeit. Die überwiegend aus basischen Aminosäuren bestehende GAG-Bindestelle des HCII ist in Abwesenheit von GAGs über intramolekulare Salzbrücken und andere Wechselwirkungen mit dem N-Terminus verbunden, welcher Gruppen von sauren Aminosäuren enthält.

Bei der Aktivierung von HCII binden die polyanionischen GAGs an die GAG-Bindestelle von HCII und verdrängen den sauren N-Terminus aus den intramolekularen Wechselwirkungen. Der so freigesetzte N-Terminus kann mit einer basischen Oberflächenstruktur von Thrombin, genannt Exosite I, interagieren. HCII steht dann sowohl über sein reaktives Zentrum, als auch über den sauren N-Terminus mit Thrombin in Kontakt, was zu der deutlichen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Der postulierte Aktivierungsmechanismus wird durch indirekte Ergebnisse unterstützt. Mehrere Veröffentlichungen beschreiben überwiegend Mutationen oder Deletionen von Elementen im HCII oder Thrombin, welche für den postulierten Aktivierungsmechanismus von Relevanz sind und die aus diesen Mutationen resultierenden Folgen.

Die hier dargestellte Arbeit untersucht, welche Funktion(en) der saure N-Terminus von HCII bei der Inhibierung von Thrombin in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat hat. Von besonderem Interesse ist dabei der Aspekt der postulierten Positionsänderung gegenüber dem Kern des Moleküls und die Funktion dieser Positionsänderung.

Mittels molekularbiologischer Methoden wurden zwei neue Cysteinreste in das HCII-Molekül eingebaut, welche eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbildeten und dadurch den sauren N-Terminus von HCII kovalent mit dem Kern des Moleküls verknüpften. Um sicherzustellen, daß sich nur eine Disulfidbrücke zwischen den zwei neu in das Molekül eingeführten Cysteinresten bilden konnte, wurden die drei natürlich im HCII vorkommenden Cysteine, welche nicht essentiell für die Reaktion zwischen HCII und Thrombin sind, gegen Serine ausgetauscht.

Bei geschlossener Disulfidbrücke konnte nur eine minimale Reaktion mit Thrombin beobachtet werden, die jedoch nicht sicher den HCII-Molekülen mit geschlossener Disulfidbrücke zugeordnet werden konnte. Heparin oder Dermatansulfat bewirkten unter diesen Bedingungen keine meßbare Beschleunigung der Reaktion. Nach Reduktion der Disulfidbrücke und Alkylierung der Cysteinreste ließ sich die untersuchte HCII-Variante wieder durch Heparin und Dermatansulfat aktivieren und inhibierte Thrombin mit sehr viel höherer Reaktionsrate.

Die erhaltenen Daten stützen die These, daß der N-Terminus eine kritische Rolle für den aktivierenden Effekt von Heparin bzw. Dermatansulfat auf die Reaktion mit Thrombin hat und zeigen, daß eine kovalente Fixierung diesen Effekt unterbindet. Die Ergebnisse sind in

Übereinstimmung mit dem Modell, nach dem der N-Terminus nach Aktivierung des Moleküls durch GAGs eine Positionsänderung gegenüber dem Kern des Moleküls durchläuft. Möglicherweise wird bei der Aktivierung von HCII über eine Konformationsänderung auch ein Einfluß auf das reaktive Zentrum ausgeübt.

B Einleitung

B.1 Überblick und funktionelle Einordnung

Heparinkofaktor II (HCII) ist ein Protease-Inhibitor, welcher zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) gehört. Der Name Serpine leitet sich von der zuerst entdeckten Fähigkeit vieler Familienmitglieder zur Hemmung von Serinproteasen ab. Neben dieser Funktion nehmen Mitglieder der Serpinfamilie jedoch noch zahlreiche andere Funktionen wahr. Heparinkofaktor II inhibiert die Serinprotease Thrombin, ein Schlüsselenzym u.a. der Blutgerinnung. Thrombin katalysiert während der Blutgerinnung u.a. die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, das in seiner polymerisierten Form ein Fibringerinnsel am Ort der Gefäßverletzung bildet. Die Aktivität von Heparinkofaktor II wird durch Glykosaminoglykane (GAGs) wie Heparin, Heparansulfat und Dermatansulfat sehr stark gesteigert. GAGs enthalten sich wiederholende saure Disaccharideinheiten, die meist kovalent an ein Kern-("core")-Protein gebunden sind und zusammen ein Proteoglykan bilden. Proteoglykane sind u.a. wichtige Bestandteile von Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix (ECM).

B.2 Blutgerinnung und Haemostase

Blutgerinnung und Reparatursysteme stellen Mechanismen des Organismus dar, welche die Integrität des vaskulären Systems nach einer Verletzung wahren. Die am Gerinnungssystem beteiligten Proteine und zellulären Komponenten befinden sich unter normalen physiologischen Bedingungen in einer inaktiven Form im Plasma. Prothrombin und die Faktoren VII, IX, X, und XI sind Serinprotease-Proenzyme, die bei der Aktivierung schnell durch Spaltung von ein oder zwei Peptidbindungen in ihre aktive Form überführt werden. Die sich ebenfalls als Proproteine im Plasma befindenden Kofaktoren V und VIII werden ebenfalls durch proteolytische Spaltung in aktive Kofaktoren überführt. Thrombozyten zirkulieren im Blut in einer inaktiven ruhenden Form. Nach Aktivierung durchlaufen sie eine Serie von biochemischen und morphologischen Veränderungen, die u.a. die Präsentation negativ geladener Phospholipide in der Plasmamembran, die Expression von Rezeptoren für die Faktoren V und VIII, die Anheftung an Oberflächen und die Bildung von Aggregaten beinhalten.

Der Ablauf der Gerinnung ist in Abbildung 1 auf der nächsten Seite dargestellt.

Auslöser der humoralen Blutgerinnung¹ über den sogenannten extrinsischen Weg ist die Verletzung von Blutgefäßen, wodurch das Blut mit einem Transmembranprotein, dem "tissue-factor" (Gewebefaktor) (TF), in Kontakt kommt (siehe Abbildung 1, Nr. 1). TF ist ein häufig vorkommendes Protein in Geweben, es kommt jedoch nicht auf der luminalen Seite von Gefäßen vor. TF bindet sowohl die aktivierte Form (VIIa), als auch die nicht aktivierte Form des Blutgerinnungsfaktors VII. Ein geringer Anteil Faktor VII (1 – 2%) befindet sich ständig in aktivierter Form im Blut. Das aktive Zentrum wird aber erst durch Bindung an TF funktionsfähig ausgebildet. Der Komplex aus TF und VIIa überführt die Faktoren X und IX in ihre aktiven Formen, Xa und IXa (2).

¹ Furie & Furie 1992, Roberts & Lozier 1992, Esmon 1993, Bombeli *et al.* 1997, Mann 1999, Dahlbäck 2000, Esmon 2000

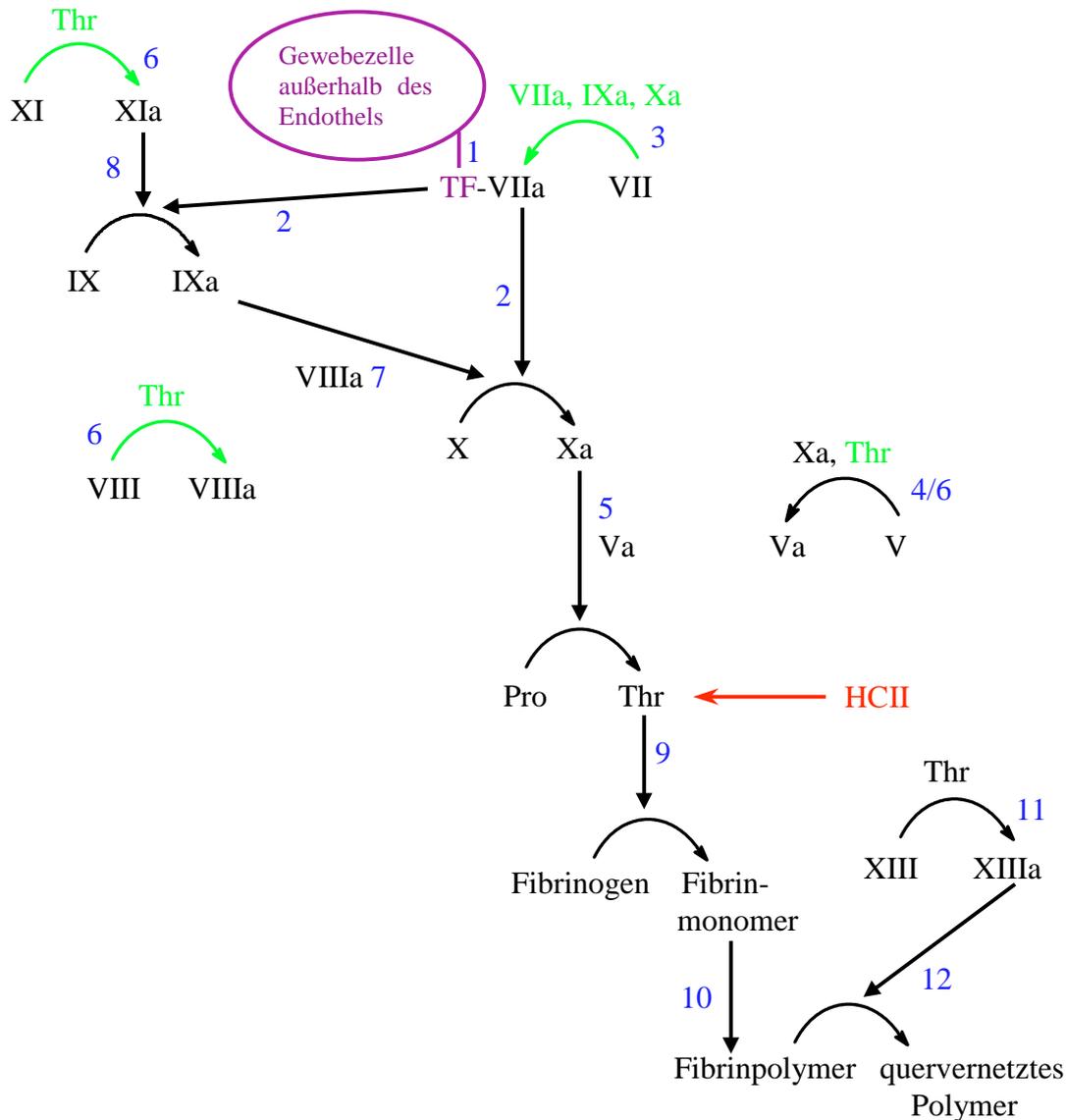


Abbildung 1: Physiologischer Weg der Blutgerinnung und systematische Stellung von HCII
 schwarz: Hauptwege der Gerinnung, grün: Rückkopplungsmechanismen, rot: systematische Stellung von HCII
 HCII: Heparinkofaktor II, Pro: Prothrombin, TF: "tissue factor", Thr: Thrombin,

Als Rückkopplungsmechanismen zur weiteren Verstärkung des Gerinnungsprozesses aktivieren VIIa, Xa und IXa TF-gebundenen Faktor VII zu VIIa (3). Zudem aktiviert Xa Faktor V zu Va (4). Faktor Xa und Va bilden auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten den sog. Prothrombinase-Komplex, der Prothrombin in Thrombin überführt (5). Als Rückkopplungsmechanismus aktiviert Thrombin Faktor V, sowie die Faktoren VIII und XI (6). Der aktivierte Faktor VIIIa und Faktor IXa bilden, ebenfalls auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten, den sog. Tenase-Komplex, welcher wiederum Faktor X zu Xa überführt (7). Die Aktivierung von Faktor X durch den Tenase-Komplex ist ca. 50 x effektiver als die Aktivierung von X durch den TF-VIIa-Komplex. Ebenso bewirken die beiden Kofaktoren Va und VIIIa eine 10⁵- bis 10⁶-fache Beschleunigung der Reaktion von IXa und Xa gegenüber der Reaktion ohne diese Kofaktoren. Der aktivierte Faktor XIa führt zur weiteren Bildung von IXa (8) und damit zu einer weiteren Steigerung der Gerinnung über den Faktor IXa-VIIIa-Weg. Thrombin spaltet aus Fibrinogen jeweils vier Fibrinopeptide heraus und überführt dieses in Fibrinmonomere (9), welche sich spontan zu Polymeren zusammenlagern (10). Das Fibrinpolymer wird durch Faktor XIIIa, welcher von Thrombin aktiviert wird (11), durch Ausbildung von Isopeptidbrücken quervernetzt (12).

Die physiologische Rolle des in Lehrbüchern häufig abgebildeten intrinsischen Gerinnungsweges über Kininogen, Kallikrein, Faktor XII und XI ist unklar. Defizienzen von Proteinen dieses Weges sind nicht mit Haemophilien verbunden, mit Ausnahme einer milden Form bei Faktor XI-Defizienz. Er ist damit für die Trauma-induzierte Gerinnung vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

Das System der Blutgerinnung bedarf einer präzisen Regulation. Eine Hyperaktivität hat ungewollter Gerinnung und damit thrombotische Effekte zur Folge, eine Hypoaktivität führt zu verminderter Gerinnungsfähigkeit und damit zu Haemophilie.

Die Regulation der Gerinnung erfolgt auf verschiedenen Ebenen des Weges. "**T**issue-**f**actor-**p**athway-**i**nhibitor" (TFPI) inhibiert den Komplex aus TF, VIIa und Xa. Die Serpine Antithrombin (AT) und Heparinkofaktor II werden durch Glykosaminoglykane an Gefäßwänden oder im Gewebe aktiviert und inhibieren Thrombin irreversibel (siehe hierzu B.5.2). AT inhibiert zusätzlich noch die Faktoren IXa, Xa und XIa. Thrombin hat neben seinen prokoagulanten Eigenschaften auch antikoagulante Eigenschaften. Abseits der Gefäßläsion bindet es an Thrombomodulin, welches sich auf der Oberfläche intakter Endothelzellen befindet und aktiviert Protein C zu aktiviertem Protein C (APC). APC spaltet zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die beiden Faktoren Va und VIIIa, welche wichtige Kofaktoren in den Prothrombinase- und Tenase-Komplexen sind. Diese Hemmechanismen bewirken, daß beispielsweise die aktive Halbwertszeit von generiertem Thrombin nur 14 Sekunden beträgt¹. Zudem sind einige Faktoren wie Faktor VIIIa extrem instabil. Untersuchungen in verschiedenen Geweben deuten jedoch darauf hin, daß die Wahrung der Haemostase gewebespezifisch unterschiedlich gewichtet sein kann². Thrombomodulin hat in der Leber beispielsweise weniger Bedeutung als in Herz und Lunge, da in der Leber die Fibrinolyse einen höheren Stellenwert besitzt.

B.3 Serinproteasen

Neben Thrombin, dem Zielenzym von Heparinkofaktor II, sind auch zahlreiche andere Gerinnungsfaktoren Mitglieder der Familie der Serinproteasen. Um den Mechanismus darstellen zu können, über welchen Serpine Serinproteasen hemmen, soll vorab der Reaktionsmechanismus von Serinproteasen dargestellt werden.

Kernstück der Serinproteasen ist die katalytische Triade im reaktiven Zentrum der Enzyme, bestehend aus einem hochreaktiven Serin 195, sowie Histidin 57 und Aspartat 102. Die Nummerierung der reaktiven Zentren aller Serinproteasen basiert auf der Nomenklatur von Chymotrypsin. Der Reaktionsablauf ist in der nachfolgenden Abbildung 2 dargestellt.

Die Hydrolyse der zu spaltenden Peptidbindung beginnt mit dem nucleophilen Angriff des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe von Ser195 auf das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung des Substrats. Die Doppelbindung der Carbonylgruppe wird dabei in eine Einfachbindung umgewandelt und das Sauerstoffatom erhält eine negative Ladung, wodurch es zum Oxyanion wird. Dieser Übergangszustand wird als tetraedrisches Zwischenprodukt bezeichnet. Das Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe des Serins wird bei diesem Vorgang auf His57 übertragen. Die Funktion von Asp102 besteht darin, über seine negativ geladene Carboxylgruppe das Histidin in der für die Aufnahme des Protons richtigen tautomeren Form zu halten und anschließend das positiv geladene Histidin zu stabilisieren. Der tetraedrische Übergangszustand wird durch die Bindung des Oxyanions in einer speziellen Oxyanionentasche des Enzyms, in welcher es mit zwei R-N-H - Gruppen der Hauptkette

¹ Goldsack *et al.* 1998

² Rosenberg & Aird 1999

interagiert, stabilisiert. Die Auflösung des Übergangszustandes erfolgt, indem das Proton von His57 auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen wird. In diesem Zustand ist Ser195 mit dem Substrat über eine Esterbindung verbunden, weswegen es als Acyl-Enzym-Intermediat bezeichnet wird. Die abgespaltene Aminkomponente diffundiert ab und wird durch Wasser ersetzt. Die anschließende Deacylierung und damit die Reaktivierung des Enzyms stellt praktisch eine Umkehrung des ersten Acylierungsschrittes dar, bei der die Aminkomponente durch Wasser ersetzt ist. Zuerst wird ein Proton des Wassers auf His57 übertragen. Das entstehende Hydroxidion greift das Carbonylsauerstoffatom der an Ser195 gebundenen Acylgruppe unter Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes an. His57 überträgt das übernommene Proton auf das Sauerstoffatom von Ser195, welches dabei das Substrat freisetzt.

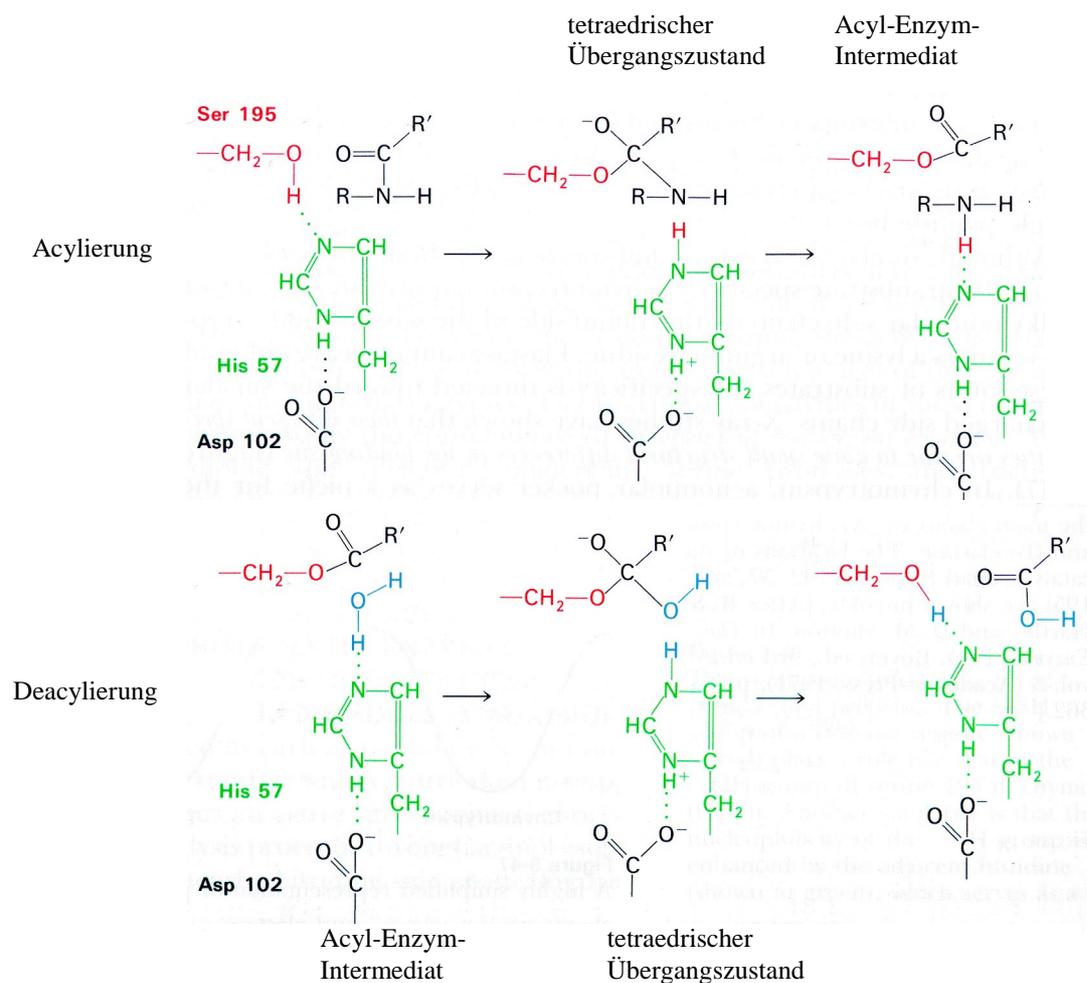


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Serinproteasen (aus Stryer 1996)

Das beschriebene Reaktionsprinzip ist allen Serinproteasen gemeinsam. Die Substratspezifität der verschiedenen Proteasen wird durch Strukturdifferenzen am Bindezentrum erreicht, die beispielsweise großen Resten den Zugang verweigern und/oder die Reste der Seitenketten der zu spaltenden Peptidbindung in speziellen Taschen binden und stabilisieren.

B.4 Serpine

Die Bezeichnung Serpin ist eine Abkürzung für **Ser**in-**P**rotease-**I**nhibitor. Sie wurde von Carrell und Travis 1985¹ für eine Gruppe von Proteinen eingeführt, von denen die Mehrheit der bekannten Mitglieder Inhibitoren von Serinproteasen sind.

Neben der Funktion als Inhibitoren von Serinproteasen wurden jedoch noch zahlreiche andere Funktionen nachgewiesen, wie beispielsweise die Hemmung von Cysteinproteasen (CrmA)², eine Beteiligung an der Blutdruckkontrolle (Angiotensinogen)³, Hormon-Bindung (Corticosteroid-bindendes Globulin)⁴, Chaperonfunktion (HSP47)⁵ oder Tumorsuppression (Maspin)⁶.

Die Superfamilie der Serpine⁷ umfaßt heute über 100 paraloge Mitglieder, welche in höheren Eukaryoten, sowohl Tiere, als auch Pflanzen, sowie in Viren vorkommen. In einzelligen Eukaryoten, Prokaryoten und Pilzen konnten bisher noch keine Serpine nachgewiesen werden⁸.

Die Präsenz von Serpinen in Metazoen, Pflanzen und Viren, aber nicht in einzelligen Eukaryoten und Prokaryoten läßt darauf schließen, daß sich Serpine während der letzten Milliarde Jahre evolviert haben⁹.

Die phylogenetische Analyse von Serpinen führt oft zu unterschiedlichen Stammbäumen und Einordnungen¹⁰, abhängig von den verwendeten Analyseverfahren (Aminosäuresequenzen, Exon-Intron-Struktur, DNA-Sequenz, dreidimensionale Struktur, chromosomale Lokalisierung) und dem verwendeten evolutionären Modell. Die von zahlreichen Autoren vorgeschlagene Eingruppierung von Serpinen aufgrund der Exon-Intron-Struktur der Gene¹¹ stellt einen Ansatz zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums dar. Je nach verwendetem Kriterium kann es zu deutlich unterschiedlichen Zuordnungen einzelner Serpine kommen. Beispiele hierfür sind HCII und Angiotensinogen, die, je nachdem ob sie aufgrund der Aminosäuresequenz oder der Exon-Intron-Struktur zugeordnet werden, in verschiedenen Positionen im Serpin-Stammbaum eingruppiert werden. Die Verwendung von "diagnostischen Aminosäuren", die von allen Mitgliedern einer Familie geteilt werden, aber von keinem Mitglied einer anderen Familie, ermöglicht es, nicht sicher zu gruppierende Serpine einzuordnen¹².

¹ Carrell & Travis 1985

² Komiyama *et al.* 1994

³ Doolittle 1983

⁴ Hammond *et al.* 1987

⁵ Hirayoshi *et al.* 1991

⁶ Zou *et al.* 1994

⁷ Potempa *et al.* 1994

⁸ Irving *et al.* 2000

⁹ Wray *et al.* 1996

¹⁰ Marshall 1993, Wright 1993, Irving *et al.* 2000

¹¹ Bao *et al.* 1987, Ragg & Preibisch 1988, Remold-O'Donnell 1993

¹² Ragg *et al.* 2001

B.4.1 Tertiärstrukturen von Serpinen

Trotz einer Sequenzidentität auf Aminosäureebene von teilweise nur ca. 30% weisen alle bisher röntgenkristallographisch untersuchten Serpine eine hoch konservierte Tertiärstruktur auf¹, die aus einem gemeinsamen Kern von ca. 360 Aminosäuren besteht².

Die charakteristischen Sekundärstrukturelemente der Serpine sind drei β -Faltblattstrukturen, die mit A bis C bezeichnet werden und neun α -Helices, welche mit A bis I bezeichnet werden². β -Faltblatt A besteht im ungespaltenen Serpin aus fünf Strängen, im gespaltenen aus sechs (siehe unten). Die β -Faltblätter B und C bestehen aus sechs bzw. drei Strängen.

Die Region der inhibitorischen Serpine, die an das aktive Zentrum der Protease bindet, wird als reaktive Schleife (reactive site loop) bezeichnet. Sie verbindet Strang 5 von β -Faltblatt A mit Strang 1 von β -Faltblatt C. Die reaktive Schleife fungiert als Pseudosubstrat für die Protease. Ihre Aminosäuren werden nach der Nomenklatur von Schechter und Berger³, beginnend vom aminoterminalen Ende her mit $P_n \dots P_3-P_2-P_1-P'_1-P'_2-P'_3 \dots P'_n$ bezeichnet. Die Spaltung durch die Protease erfolgt dabei in der Peptidbindung zwischen P_1 und P'_1 . Die reaktive Schleife, die meist eine Größe von ca. 20 Aminosäuren hat (meist $P_{15}-P'_5$), weist zwischen verschiedenen Serpinen eine hohe Variabilität sowohl bezüglich der Sequenz, als auch bezüglich der Konformation auf, wobei die Proteasespezifität inhibitorischer Serpine wesentlich durch die Aminosäure in der Position P_1 mitbestimmt wird⁴.

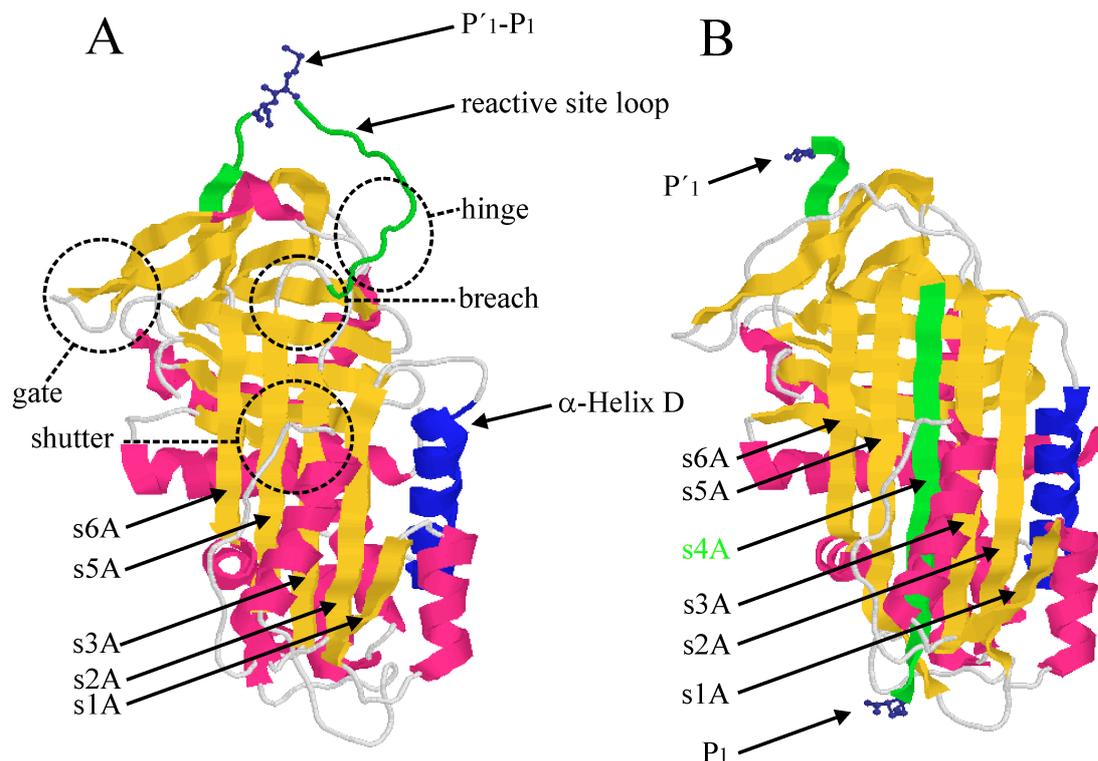


Abbildung 3: Tertiärstruktur und wichtige Regionen der Serpine am Beispiel von ungespaltenem (A) und gespaltenem (B) α_1 -Antitrypsin. Die beiden Aminosäuren P_1 und P'_1 sind als Kugel-Stab-Modell dunkelblau hervorgehoben, die reaktive Schleife ist grün dargestellt, α -Helix D blau. Die einzelnen Stränge von β -Faltblatt A sind mit s1A bis s6A bezeichnet. Die Abbildungen basieren auf den Protein Data Bank Einträgen 1QLP (A) und 7API (B) (siehe D.2.3)

¹ Huber & Carrell 1989, Whistock *et al.* 1998

² Gettins *et al.* 1996

³ Schechter & Berger 1967

⁴ Carrell & Travis 1985

Nach der Spaltung der P₁-P'₁-Bindung kommt es in inhibitorischen Serpinen zu einer drastischen Konformationsänderung (siehe Abbildung 3). Der aminoternale Teil der reaktiven Schleife klappt um und legt sich als zusätzlicher Strang 4 in das β -Faltblatt A zwischen die beiden vorher bereits vorhandenen Stränge 3 und 5. Dieser Vorgang wird als S→R Übergang bezeichnet¹.

Im ungespaltenen Zustand liegt das Serpin in einer gespannten (stressed) Konformation vor, welche thermodynamisch metastabil ist. Die Konformationsänderung in den entspannten (relaxed) Zustand ist mit einer deutlichen Steigerung der thermodynamischen Stabilität verbunden². Dieser Zustand wird als hyperstabil bezeichnet. Am deutlichsten ist dies an der Änderung der Schmelztemperatur zu erkennen. Während ungespaltenes α_1 -Antitrypsin bereits bei 58°C denaturiert, muß für die Denaturierung der gespaltenen Form eine Temperatur von über 100°C aufgebracht werden.

Neben den beschriebenen "S"- und "R"-Zuständen gibt es beim Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 noch einen natürlich vorkommenden latenten Zustand, bei welchem die ungespaltene reaktive Schleife ins β -Faltblatt A inseriert ist.

Die strenge Konservierung der Sekundärstrukturelemente (mit Ausnahme einiger viraler Serpine) läßt vermuten, daß das Serpin-Grundgerüst wesentliche Veränderungen nicht tolerieren kann³. Größere Insertionen und Deletionen von Sequenzen findet man nur in Bereichen, die Sekundärstrukturelemente verbinden, am stärksten ausgeprägt in der reaktiven Schleife und in der Schleife, welche α -Helix C und D verbindet.

Für die Kontrolle und Modulation der Serpin-Konformation sind vier wichtige Regionen identifiziert worden (siehe Abbildung 3):

- 1) die "hinge"-Region (hinge = Scharnier), meist in den Positionen P₁₅-P₉, die für das Umklappen der reaktiven Schleife essentiell ist⁴.
- 2) die "breach"-Region (breach = Bresche) an der Spitze des β -Faltblatts A, die den Punkt der initialen Insertion der reaktiven Schleife ins β -Faltblatt A darstellt⁵.
- 3) die "shutter"-Region (shutter = Verschuß) nahe dem Zentrum von β -Faltblatt A, welche die Öffnung von β -Faltblatt A im ungespaltenen Serpin verhindert.
- 4) die "gate"-Region (gate = Tor), welche die Stränge 3 und 4 des β -Faltblatts C beinhaltet und für den Übergang in den latenten Zustand von Bedeutung ist⁶.

Möglicherweise hat auch die α -Helix F eine Funktion bei der Öffnung von β -Faltblatt A⁷.

Einige Serpine werden durch GAGs wie Heparin allosterisch aktiviert. Bei Heparinkofaktor II und AT ist dabei u.a. die α -Helix D (blau hervorgehoben in Abbildung 3) von wesentlicher Bedeutung.

¹ Carrell & Owen 1985

² Bruch *et al.* 1988

³ Sheffield & Blajchman 1995, Irving *et al.* 2000

⁴ Hopkins *et al.* 1993

⁵ Whisstock *et al.* 2000

⁶ Mottonen *et al.* 1992

⁷ Gooptu *et al.* 2000

B.4.2 Inhibitionsmechanismus von Serpinen

Inhibitorische Serpine arbeiten nach dem Prinzip der Suizid-Inhibition, d.h. sie werden von den Zielproteasen als Substrat erkannt und als solches gebunden. Die reaktive Schleife der Serpine dient dabei gewissermaßen als "Köder", der von der Protease erkannt und irreversibel gespalten wird. Der Ablauf der Reaktion zwischen Serinprotease und Serpin wird durch das "branched-pathway-Modell" beschrieben¹.

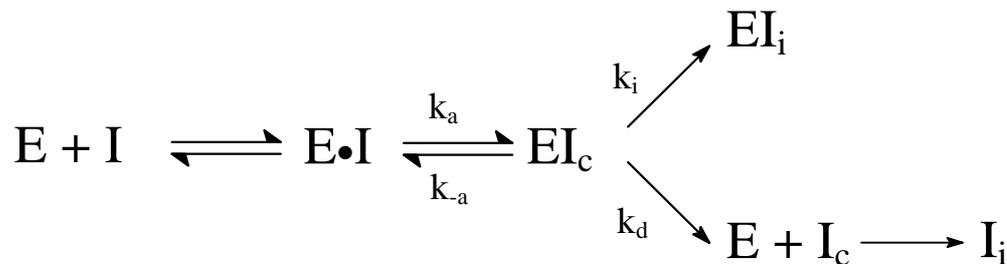


Abbildung 4: "branched-pathway-Modell" der Serpin-Serinprotease-Reaktion

Nach dieser Vorstellung bindet das proteolytische Enzym (E) im ersten Schritt reversibel an die reaktive Schleife des Inhibitors (I) und bildet einen sog. "Michaelis-Komplex" (E•I). Dieser kann entweder unter Regenerierung des freien Enzyms und des aktiven Inhibitors dissoziieren oder die Spaltung der Peptidbindung kann unter Bildung eines kovalenten Acyl-Enzym-Intermediates (EI_c) initiiert werden (siehe auch B.3). Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die Spaltung analog zur Spaltung eines normalen Substrates. Der Inhibitor ist dabei bereits gespalten (I_c), die reaktive Schleife befindet sich jedoch noch in der ursprünglichen exponierten Position "oberhalb" des Proteins (siehe Abbildung 5 Teil A). Für das Intermediat gibt es anschließend zwei mögliche Wege. Beim ersten inseriert die reaktive Schleife des Serpins partiell oder vollständig ins β-Faltblatt A unter Bildung eines irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI_i), mit Halbwertszeiten im Bereich von Jahren². Die Protease bleibt dabei im Acyl-Enzym-Intermediat-Zustand am Serpin gebunden und die Deacylierungsreaktion kann nicht mehr stattfinden. Dieser von Lawrence *et al.*³ vorgeschlagene Inhibitionsmechanismus wurde bereits mehrfach experimentell bestätigt⁴. Alternativ kann der EI_c-Komplex eine Deacylierung durchlaufen, mit Freisetzung des gespaltenen inaktiven Inhibitors (I_i) und der aktiven Protease (E). Entscheidend für den tatsächlich eingeschlagenen Weg scheint die Geschwindigkeit zu sein, mit welcher die reaktive Schleife die Konformationsänderung durchläuft. Dies wurde anhand von Mutanten gezeigt, bei denen verschiedene Aminosäuren in Position P₁₄ der "hinge"-Region eingebaut wurden, die verschieden gut bzw. schnell ins β-Faltblatt A inserierten⁵. Die genaue Beschreibung des Mechanismus, wie ein Serpin eine Serinprotease inhibieren kann, wurde durch die Kristallisation und röntgenkristallographische Untersuchung eines α₁-Antitrypsin-Trypsin-Komplexes durch Huntington *et al.*² im Jahr 2000 erbracht.

¹ Gettins *et al.* 1996, Kvassman *et al.* 1998, Lawrence *et al.* 2000

² Huntington *et al.* 2000 a

³ Lawrence *et al.* 1995

⁴ Egelund *et al.* 1998, Stone & Le Bonniec 1997

⁵ Lawrence *et al.* 2000

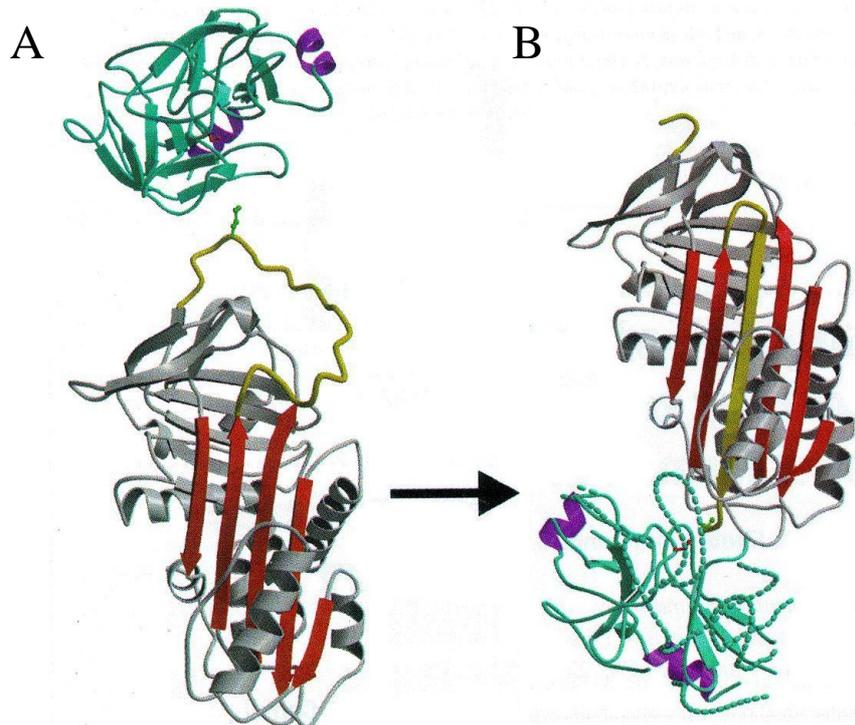


Abbildung 5: A) Bildung des Komplexes zwischen α_1 -Antitrypsin (unten) und Trypsin (oben). B) Serpin-Protease-Komplex. Die Protease wurde beim Einklappen der gespaltenen reaktiven Schleife in das β -Faltblatt A um das gesamte Serpin herumgeführt. Die Regionen des Trypsins, deren dreidimensionale Struktur deformiert wurden, sind gestrichelt dargestellt. (aus: Huntington *et al.* 2000 a)

gelb: reaktive Schleife des α_1 -Antitrypsin, rot: β -Faltblatt A von α_1 -Antitrypsin, cyan/violett: Trypsin

Nach der Spaltung im reaktiven Zentrum des α_1 -Antitrypsin klappt der proximale Teil der reaktiven Schleife um und lagert sich vollständig in das β -Faltblatt A ein. Die über das Acyl-Enzym-Intermediat gebundene Protease wird dabei um das Serpin herumgeführt, was einer Strecke von 71 Angström entspricht. Die dreidimensionale Struktur des Protease-gekoppelten gespaltenen Serpins ist nach der Konformationsänderung praktisch identisch mit der des einzelnen gespaltenen α_1 -Antitrypsin. Beim Umklappen der reaktiven Schleife wird die Serinprotease am Körper des Serpins regelrecht "zerquetscht", was sich darin äußert, daß 37% der Proteasestruktur deformiert werden. Die wichtigste Strukturveränderung erfährt Ser195 im katalytischen Zentrum, welches sechs Angström von seinem Reaktionspartner His57 fortgezogen wird. Gleichzeitig wird bei diesem Vorgang auch noch die Oxianiontasche zerstört. Das deformierte Trypsin ist in diesem Zustand nicht mehr in der Lage, die Deacylierung durchzuführen. Ein wichtiger Faktor des Inhibitionsmechanismus scheint die begrenzte Länge der reaktiven Schleife zu sein, da diese bei der Deformation der Protease am Körper des Serpins den Zug auf Ser195 ausübt. Gezeigt wurde dies durch eine mutierte Form von α_2 -Antiplasmin, welche eine zusätzliche Aminosäure in der reaktiven Schleife enthält und dadurch ihre inhibitorische Fähigkeit verliert¹.

Die im obigen Beispiel beschriebene vollständige Insertion der reaktiven Schleife ins β -Faltblatt A als essentieller Bestandteil des Inhibitionsmechanismus ist jedoch noch umstritten. Mehrere Veröffentlichungen unterstützten das ursprünglich von Wright und Scarsdale² vorgeschlagene Modell der vollständigen Insertion³. Eine neue Veröffentlichung von O'Malley & Cooperman⁴ über die Inhibition von Chymotrypsin durch α_1 -Antichymotrypsin

¹ Holmes *et al.* 1987

² Wright & Scarsdale 1995

³ Stratikos & Gettins 1997, Stratikos & Gettins 1998, Stratikos & Gettins 1999, Lawrence *et al.* 2000, Gooptu *et al.* 2000

⁴ O'Malley & Cooperman 2001

lieferte jedoch Ergebnisse, die mit einer vollständigen Insertion der reaktiven Schleife ins β -Faltblatt A unvereinbar sind. Dem alternativ vorgeschlagenen Modell nach, würde eine partielle Insertion der reaktiven Schleife ins β -Faltblatt A, bei welcher die Protease "oberhalb" des Serpins verbleibt, für die irreversible Hemmung bereits ausreichen.

B.4.3 Humanserpine und ihre medizinische Bedeutung

Humane Serpine haben eine Vielzahl verschiedener Funktionen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige humane Serpine, ihre Funktion und die Folgen von Serpin-Fehlfunktionen.

Inhibitorische Serpine			
Serpin	Zielprotease	Funktion	Folgen von Fehlfunktion
α_1 -Antichymotrypsin	Cathepsin G	verhindert Gewebeerstörung	Emphysem
α_2 -Antiplasmin	Plasmin	Hemmung von Plasmin	Haemorrhagie
α_1 -Antitrypsin	Elastase	verhindert Gewebeerstörung	Emphysem, Zirrhose
Antithrombin	Thrombin, Faktoren IXa, Xa, XIa,	Inhibition der Blutgerinnungskaskade	Thrombose
C ₁ -Inhibitor	C ₁ -Esterase, Kallikrein, Faktor XIIa	Kontrolle der Komplementkaskade	Angioödem
Heparinkofaktor II	Thrombin, Cathepsin G	Hemmung von Thrombin	Thrombose (?)
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1	t-PA, u-PA	Kontrolle der Fibrinolyse	Haemorrhagie

Nicht-inhibitorische Serpine		
Serpin	Funktion	Folgen von Fehlfunktion
Angiotensinogen	Blutdruckkontrolle	Bluthochdruck
Cortisol-bindendes Globulin	Steroid-Carrier	(?)
Maspin	verhindert Tumorgenese	Metastasenbildung (?)
Thyroxin bindendes Globulin	Thyroxin-Carrier	(?)

Tabelle 1: repräsentative Auswahl humaner Serpine, ihre Funktion und Folgen von Fehlfunktionen (mod. nach Whisstock *et al.* 1998) t-PA: Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator, u-PA: Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator, (?): nicht bekannt, oder nicht sicher.

Neben den oben erwähnten Krankheiten, die durch funktionsunfähige Serpine hervorgerufen werden, sind Serpine auch an einer Gruppe von Krankheiten beteiligt, die als "conformational diseases" bezeichnet werden. Gemeinsam ist ihnen eine abnormale Proteinfaltung, die zu einer Aggregation der Proteine führt. Bei Serpinen findet man mehrere Krankheiten, die mit der Bildung von sogenannten "loop-sheet-Polymeren" verbunden sind. Mutationen, meist im Bereich des Shutters, führen dazu, daß sich das β -Faltblatt A im ungespaltenen Serpin öffnet und sich die ungespaltene reaktive Schleife eines zweiten Serpins einlagert. Einige Formen von α_1 -Antitrypsin¹-, Antithrombin²- bzw. C₁-Inhibitor-Defizienz³ sind mit der Bildung von "loop-sheet-Polymeren" verbunden. Neben der Bildung von "loop-sheet-Polymeren", die nur aus Serpinen bestehen, können sich Proteinaggregate auch dadurch bilden, daß sich die reaktive Schleife von Serpinen in β -Faltblattstrukturen anderer Proteine einlagert. Ein solches Beispiel ist die Bildung von "loop-sheet-Polymeren" zwischen der reaktiven Schleife von Serpinen und dem β -Amyloid-Protein bei der Alzheimer-Krankheit⁴.

¹ Lomas *et al.* 1992

² Devraj-Kizuk *et al.* 1988

³ Eldering *et al.* 1995

⁴ Eriksson *et al.* 1995

B.5 Heparinkofaktor II

Der antithrombotische Effekt von Heparin und verwandten Glykosaminoglykanen beruht auf der Aktivierung zweier Plasma-Protease-Inhibitoren: Antithrombin (AT, alte Bezeichnung Antithrombin III) und Heparinkofaktor II (HCII), welche beide Thrombin irreversibel durch Bildung von SDS-stabilen Komplexen im Verhältnis 1:1 inhibieren. Die erste Trennung und partielle Aufreinigung dieser beiden Proteine erfolgte 1974 durch Briginshaw und Shanberge¹, welche sie als Heparinkofaktor A und B bezeichneten. Heparinkofaktor B wurde später als AT identifiziert, Heparinkofaktor A als HCII. Neben der Bezeichnung Heparinkofaktor II finden sich in älteren Literaturquellen noch die Bezeichnungen Antithrombin BM², Dermatansulfat Kofaktor³ und Leuserpin-2⁴. Die erste genauere Charakterisierung von gereinigtem HCII erfolgte 1982 durch Tollefsen *et al.*⁵, die Bestimmung der Aminosäuresequenz und die Charakterisierung der cDNA durch Ragg 1986⁶.

Eigenschaft		Literaturquelle
Aminosäuren	480 Aminosäuren	Ragg 1986
Signalpeptid im Pro-Protein	19 Aminosäuren	Blinder <i>et al.</i> 1988
Molekulargewicht	65,6 kDa	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Stokes Radius	3,4 nm	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Kohlenhydratanteil	~ 10 % (w/v)	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
pot. N-Glykosylierungsstellen	Asn30, Asn169, Asn 368	Ragg 1986
reaktives Zentrum (P ₁ -P' ₁)	Leu444 - Ser445	Griffith <i>et al.</i> 1985 b
Tyrosin-Sulfatierungen	Tyr60, Tyr73	Hortin <i>et al.</i> 1986
Cysteine / Disulfidbrücken	Cys273, Cys323, Cys467 / keine	Ragg 1986 / Church <i>et al.</i> 1987
Plasma-Konzentration	90 µg/ml (1,37µM)	Tollefsen <i>et al.</i> 1982
Halbwertszeit im Plasma	~ 2,5 Tage	Sié <i>et al.</i> 1985 b

Tabelle 2: Eigenschaften von humanem HCII

Humanes HCII ist ein einzelsträngiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ~65600 Da.⁷ Nach Abspaltung eines 19 Aminosäure-langen Signalpeptides⁸ enthält das reife Protein 480 Aminosäuren⁶. HCII enthält drei potentielle N-Glykosylierungsstellen⁶. Die Kohlenhydrate machen ca. 10 % des Molekulargewichts von HCII aus⁵. Innerhalb des reifen Proteins gibt es drei Cysteinreste, die jedoch keine Disulfidbrücken bilden⁹. Durch Modifikation der Thiolgruppen mit Iodacetamid bzw. Iodessigsäure konnte gezeigt werden, daß sie für die Reaktion zwischen HCII und Thrombin nicht essentiell sind. Interessanterweise sind die Positionen der drei Cysteine (im humanen HCII in den Positionen 273, 323, 467) bei allen bisher sequenzierten HCIIs (Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn und Frosch) konserviert¹⁰.

¹ Briginshaw & Shanberge 1974

² Wunderwald *et al.* 1982

³ Abildgaard & Larsen 1984

⁴ Ragg 1986, Ragg & Preibisch 1988; Ragg *et al.* 1990 a&b, Westrup & Ragg 1994

⁵ Tollefsen *et al.* 1982

⁶ Ragg 1986

⁷ Tollefsen *et al.* 1982

⁸ Blinder *et al.* 1988

⁹ Church *et al.* 1987

¹⁰ Ragg 1986, Westrup & Ragg 1994, Zhang *et al.* 1994, Sheffield *et al.* 1994, Colwell & Tollefsen 1998

HCII weist eine Aminosäure-Sequenzidentität von ca. 30% zu AT auf, ebenso wie zu anderen Serpinen. Die ersten ca. 80 Aminosäuren von HCII zeigen jedoch keinerlei Homologie zu anderen Mitgliedern der Serpinfamilie. Dieser N-terminale Bereich des Moleküls enthält zwei Blöcke mit sauren Aminosäuren zwischen den Positionen 53 bis 64, bzw. 69 bis 78. Innerhalb dieser sauren Bereiche ist zudem noch jeweils ein Tyrosinrest sulfatiert¹. Die beiden sauren Blöcke im N-Terminus von HCII weisen Ähnlichkeiten mit der carboxyterminalen Domäne von Hirudin auf². Dieser, aus dem Blutegel (*Hirudo medicinalis*) stammende 65 Aminosäuren große Thrombininhibitor, interagiert über sein saures Carboxyende mit einer basischen Oberflächenstruktur des Thrombins, welche als Exosite I bezeichnet wird³ (siehe hierzu auch B.5.2).

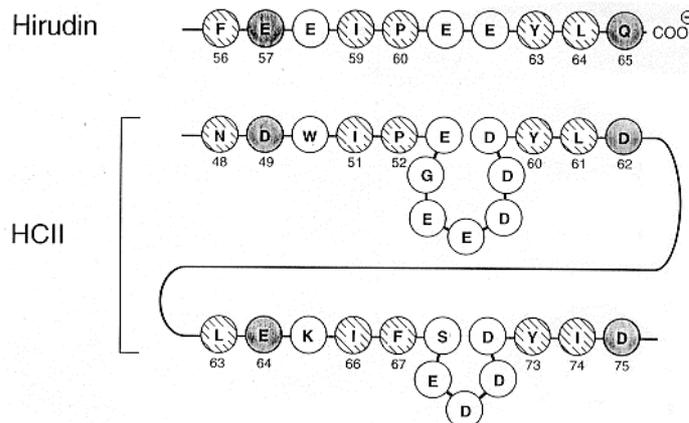


Abbildung 6: Sequenzvergleich zwischen dem C-terminalen Ende von Hirudin und den beiden sauren Blöcken im N-terminalen Bereich von HCII. grau: Aminosäuren von Hirudin, die ionische Kontakte mit der Exosite I von Thrombin bilden, gestreift: Aminosäuren von Hirudin, die hydrophobe Kontakte mit der Exosite I bilden. Analoge Aminosäuren im HCII sind entsprechend gekennzeichnet (aus van Deerlin & Tollefsen 1991).

Da bislang keine Röntgenstrukturdaten von HCII vorliegen, lassen sich über die Struktur und räumliche Anordnung des N-Terminus nur indirekte Aussagen treffen (siehe hierzu B.5.2). Die Kernstruktur von HCII wird, davon kann aufgrund der strengen Konservierung der Tertiärstruktur aller bisher untersuchten Serpine ausgegangen werden (siehe B.4.1), die typischen Serpinstrukturelemente zeigen.

HCII besitzt in Position P₁ der reaktiven Schleife ein Leucin, der Grund für die Wahl der Bezeichnung Leuserpin-2. Dies ist für einen Thrombin-Inhibitor sehr ungewöhnlich, da Thrombin bevorzugt Substrate mit einer Arg-X-Bindung spaltet. AT beispielsweise besitzt in Position P₁ ebenfalls ein Arginin. Serpine mit einem Leucin in reaktiven Zentrum hemmen bevorzugt Chymotrypsin oder Cathepsin G. Es verwundert daher nicht, daß HCII ebenfalls in der Lage ist, Chymotrypsin und Cathepsin G zu hemmen⁴, allerdings mit deutlich geringerer Effizienz als α_1 -Antichymotrypsin. Die Inhibition von Chymotrypsin und Cathepsin G durch HCII wird jedoch, ungleich der Hemmung von Thrombin, nicht durch GAGs beschleunigt. Die Tatsache, daß Leucin in Position P₁ von HCII eine, für die Hemmung von Thrombin eher ungeeignete Aminosäure ist, wird durch Experimente untermauert, bei denen es gegen Arginin ausgetauscht wurde⁵. Die Mutation L444R steigert die Inhibitionsrate gegenüber Thrombin in der Abwesenheit von GAGs um einen Faktor von ~100, eliminiert aber die Fähigkeit von HCII Chymotrypsin zu hemmen.

¹ Hortin *et al.* 1986

² Ragg *et al.* 1990 a

³ Chang 1983

⁴ Church *et al.* 1985, Pratt *et al.* 1990

⁵ Derechin *et al.* 1990

B.5.1 HCII-Genstruktur und systematische Einordnung

Das Gen für HCII befindet sich im menschlichen Genom auf Chromosom 22 im Chromosomenbereich 22q11¹. Es erstreckt sich über einen Bereich von 15,8 kB und besteht aus fünf Exons und vier Introns. In der Leber wird aus der prä-mRNA eine mRNA von 2,3 kB gebildet². HCII-mRNA konnte ebenfalls in Lunge, Niere, Plazenta, Herz und Gehirn nachgewiesen werden (siehe B.5.3)³. In einer Lungen-cDNA-Bank konnte HCII-cDNA gefunden werden, die am 5'-Ende des 2. Exons verlängert ist. Der genaue Startpunkt des Transkripts konnte nicht ermittelt werden, allerdings scheint das aus Lebertranskripten bekannte Exon 1 nicht vorhanden zu sein. Der kodierende Bereich der mRNAs aus Lunge und Leber ist jedoch identisch⁴.

Das beschriebene Muster aus fünf Exons und vier Introns stimmt mit der Gen-Grundstruktur der α_1 -Antitrypsin-Familie der Serpine überein. Obwohl die Aminosäuresequenz von HCII auch bereits zu anderen Einordnungen geführt hat, kann HCII durch die Verwendung "diagnostischer Aminosäuren" (siehe B.4) in die α_1 -Antitrypsin-Familie zusammen mit α_1 -Antitrypsin, Protein C Inhibitor, α_1 -Antichymotrypsin, Angiotensinogen u.a. eingeordnet werden⁵. Es sei angemerkt, daß das funktionell dem HCII am meisten ähnelnde AT nicht zur α_1 -Antitrypsin-Familie gehört, sondern eine eigene Familie darstellt.

B.5.2 HCII-Aktivierung durch Glykosaminoglykane

Die Geschwindigkeit der Hemmung von Thrombin durch HCII wird durch die Zugabe von GAGs wie Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat um einen Faktor >1000 gesteigert. Je nach Literaturquelle⁶ liegen die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für die Hemmung von Thrombin in der Abwesenheit von GAGs in der Größenordnung von 10^4 bis $10^5 \text{ x mol}^{-1} \text{ x min}^{-1}$. Die Zugabe von Heparin oder Dermatansulfat steigert sie auf Größenordnungen von 10^7 bis $10^8 \text{ x mol}^{-1} \text{ x min}^{-1}$.

Die Bindung von Heparin an HCII ist dabei, im Gegensatz zur Aktivierung von AT, nicht abhängig von der Sequenz des Heparins. HCII bindet die meisten Heparin-Oligosaccharide mit mehr als vier Zuckereinheiten unabhängig von deren Sequenz⁷. Es sei angemerkt, daß HCII für die maximale Inhibierung von Thrombin eine ca. 10-fach höhere Konzentration an Heparin benötigt als AT⁸. Die Bindung von HCII an Dermatansulfat erfolgt jedoch mit hoher Spezifität an eine definierte Hexasaccharidsequenz⁹ (siehe auch B.6).

¹ Herzog *et al.* 1991

² Ragg 1986, Blinder *et al.* 1988, Herzog *et al.* 1991

³ Kamp *et al.* 2001

⁴ Schmidt 1997

⁵ Ragg *et al.* 2001

⁶ Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989, Blinder & Tollefsen 1990, Derechin *et al.* 1990, Ciaccia *et al.* 1997 a, Han *et al.* 1997, Liaw *et al.* 1999, Hayakawa *et al.* 2000 a

⁷ Maimone 1990

⁸ Tollefsen *et al.* 1982, Tollefsen *et al.* 1983

⁹ Maimone & Tollefsen 1990

Innerhalb des HCII-Moleküls gibt es drei Molekülbereiche, welche für die Hemmung von Thrombin und die Aktivierung durch GAGs von besonderer Bedeutung sind (siehe Abbildung 3, Abbildung 7 und Abbildung 8):

- 1) Die reaktive Schleife mit dem reaktiven Zentrum P₁-P'₁, bestehend aus den Aminosäuren Leu444 und Ser445. Die reaktive Schleife und das reaktive Zentrum werden vom katalytischen Zentrum des Thrombin als Substrat erkannt und die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren P₁ und P'₁ hydrolysiert (zum Inhibitionsmechanismus von Serpinen siehe B.4.2). Das für ein Substrat bzw. einen Inhibitor von Thrombin eher ungünstige Leucin in Position P₁ bewirkt, daß die Reaktion mit Thrombin, sofern sie ausschließlich über das reaktive Zentrum erfolgt, mit relativ geringer Effizienz stattfindet.
- 2) Die Glykosaminoglykan-Bindestelle¹: Sie besteht aus einer Gruppe von basischen Aminosäuren, die, bis auf eine Ausnahme, im Bereich von α -Helix D positioniert sind. Die Ausnahme ist Lys173, welches sich zwischen α -Helix C und D befindet. Durch Mutation einzelner Aminosäuren konnte gezeigt werden, daß die Bindestellen für Heparin und Dermatansulfat nicht identisch sind, aber teilweise überlappen². Während Lys173 ausschließlich eine Funktion bei der Bindung von Heparin hat, wirken Arg184 und Lys185 sowohl bei der Bindung von Heparin, als auch von Dermatansulfat mit. His188, Arg189, Arg192 und Arg193 sind primär für die Bindung von Dermatansulfat von Bedeutung.

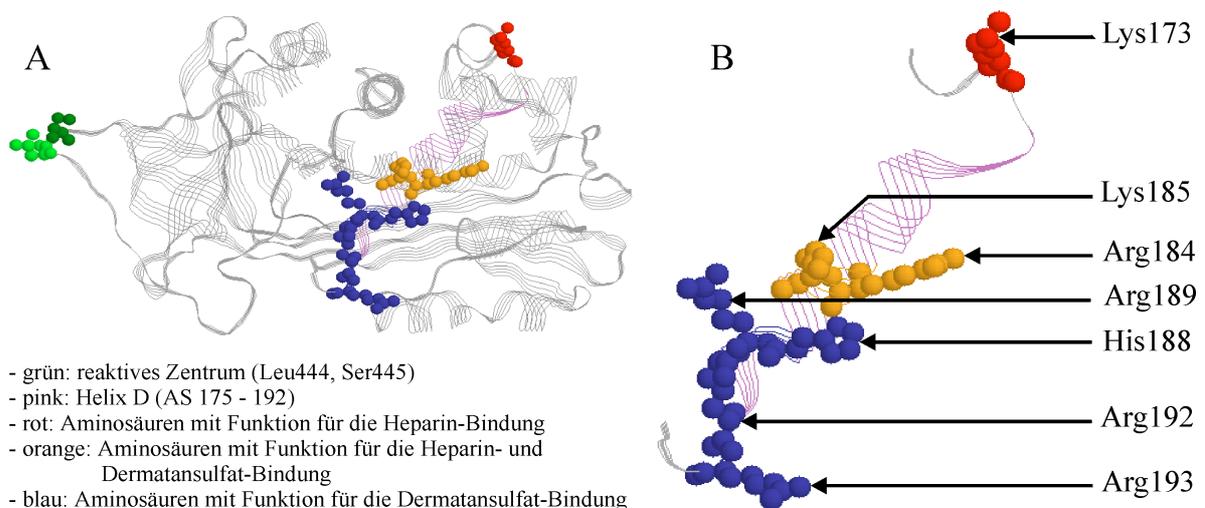


Abbildung 7: Glykosaminoglykan-Bindestelle von HCII. Dargestellt ist ein dreidimensionales Modell der Aminosäuren 105-480 von HCII (siehe D.2.3 und E.1).

A) Gesamtansicht von HCII, B) Detailansicht der GAG-Bindestelle

- 3) Die zwei sauren Blöcke im N-terminalen Bereich von HCII zwischen den Positionen 53 bis 64 bzw. 69 bis 78 (siehe Abbildung 8).

¹ Blinder *et al.* 1989, Ragg *et al.* 1990 a & b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991

² Ragg *et al.* 1990 a & b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991, Colwell *et al.* 1999, Liaw *et al.* 1999

Für die Aktivierung von HCII durch GAGs gibt es folgendes Modell¹:

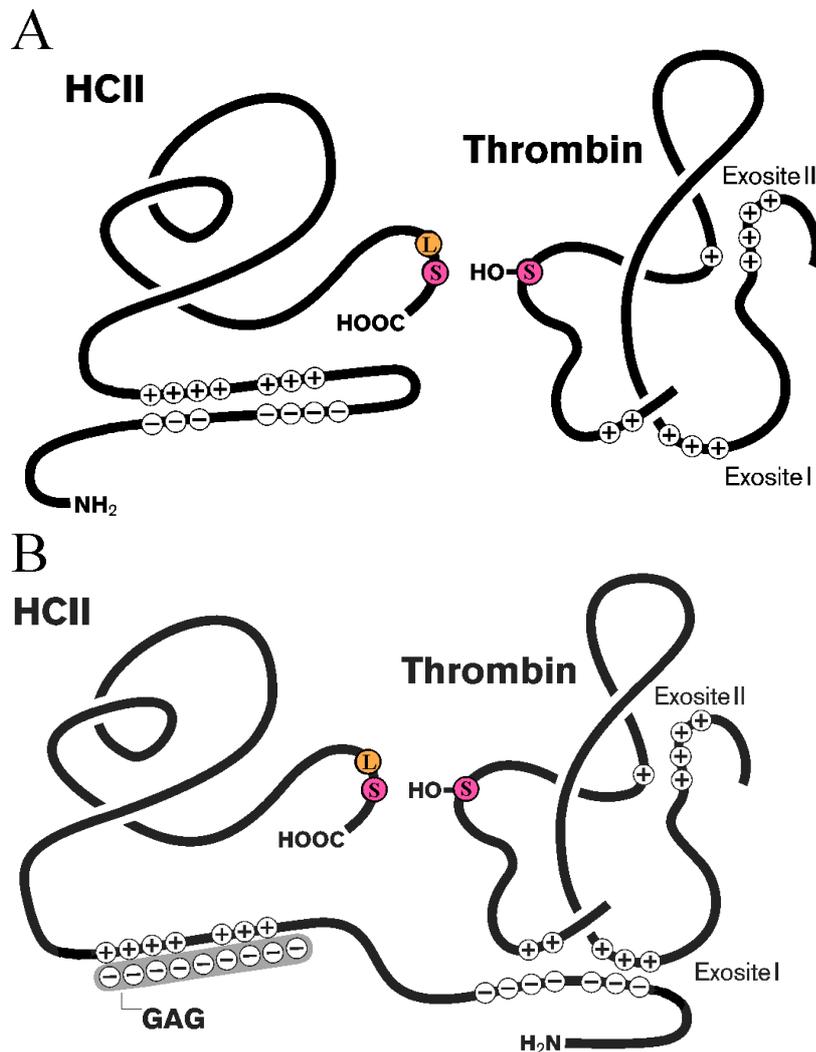


Abbildung 8: Inhibition von Thrombin durch HCII in Ab- bzw. Anwesenheit von GAGs.

In der Abwesenheit von GAGs (Teil A in Abbildung 8) reagiert HCII nur über sein reaktives Zentrum (Leu444-Ser445) mit Thrombin. Das, für die Reaktion mit Thrombin eher ungünstige Leucin in Position P1 von HCII bewirkt, daß die Reaktion nur mit geringer Effizienz stattfindet. Die sauren Blöcke im N-Terminus von HCII sind intramolekular an die basische GAG-Bindestelle über elektrostatische und andere Wechselwirkungen angelagert. Für die Bindung des N-Terminus an den Körper des Proteins ist zudem noch Arg200 von Bedeutung² (siehe Abbildung 35 bis Abbildung 40, ab Seite 109).

Für die Thrombininhibition in Gegenwart von GAGs (Abbildung 8 Teil B) sind neben dem reaktiven Zentrum von Thrombin zwei weitere Molekülbereiche im Thrombin von Bedeutung, die vorab beschrieben werden sollen.

Diese beiden exponierten Bereiche bestehen aus Gruppen von basischen Aminosäuren und werden als Exosite I und Exosite II bezeichnet³. Exosite I wird auch als Fibrin(ogen)-Erkennungsstelle bezeichnet. Ihre Funktion ist die einer primären Andockstelle für Substrate wie Fibrinogen und Inhibitoren. Der Carboxyterminus des Thrombininhibitors Hirudin, welcher Ähnlichkeit mit den sauren Blöcken im N-terminalen Bereich von HCII hat, bindet

¹ Ragg *et al.* 1990 a

² Ciaccia *et al.* 1997 b

³ Berliner 1992, Rogers *et al.* 1992

ebenfalls an diese Stelle. Exosite II wird auch als Heparin-bindende Exosite bezeichnet und bindet u.a. Heparin.

Bei der HCII-Aktivierung durch GAGs binden die polyanionischen GAGs an die positiv geladene GAG-Bindestelle von HCII und verdrängen den N-terminalen sauren Bereich von HCII aus seiner Bindung an der GAG-Bindestelle. Der freigesetzte Hirudin-ähnliche saure N-Terminus von HCII kann dadurch an die Exosite I von Thrombin binden. Hierdurch bildet sich ein Michaelis Komplex zwischen HCII und Thrombin mit zwei Kontaktregionen zwischen den beiden Molekülen. Dieser nicht-kovalente Zustand wird stabilisiert durch die Interaktion zwischen dem Hirudin-ähnlichen N-Terminus von HCII und Exosite I von Thrombin auf der einen Seite und dem reaktiven Zentrum von HCII und dem katalytischen Zentrum von Thrombin auf der anderen Seite. Der bizentrische initiale Komplex zwischen HCII und Thrombin ermöglicht den enzymatischen Angriff der Protease auf das reaktive Zentrum von HCII, und daraus resultierend die Inaktivierung der Serinprotease mit einer sehr viel höheren Effizienz, als in der Abwesenheit von GAGs.

Für die Heparin-katalysierte Reaktion zwischen HCII und Thrombin wurde zudem gezeigt, daß Heparin einen "template"-Effekt hat¹. Heparin mit einem Minimum von 16-20 Zuckereinheiten bildet eine Brücke zwischen der GAG-Bindestelle von HCII und der Exosite II von Thrombin und beschleunigt so durch ein Zusammenbringen der Reaktionspartner die Hemmreaktion. Der Effekt ist jedoch relativ gering, da die Entfernung von Exosite II nur eine Verlangsamung der Reaktion um den Faktor sieben bewirkt. Dermatan sulfat hat keinen "template"-Effekt. Der gleiche Effekt ist auch für die Reaktion von AT mit Thrombin von Bedeutung².

Neben dem beschriebenen Inhibitionsmodell in der Abwesenheit von GAGs, bei dem die Hemmung von Thrombin ausschließlich über das reaktive Zentrum erfolgt, scheint es auch denkbar, daß bei einem geringen Anteil der HCII-Moleküle sich der saure aminoterminele Bereich spontan, ohne GAG-Einfluß von seiner Bindung an der GAG-Bindestelle löst. Dieser geringe Anteil könnte dann aufgrund seiner deutlich erhöhten Reaktivität gegenüber Thrombin zu einem signifikanten Anteil an der Hemmung von Thrombin in der Abwesenheit von GAGs beitragen.

Den beiden sauren Blöcken im N-terminalen Bereich von HCII werden in der Literatur unterschiedliche Funktionen zugeordnet³. Vom zweiten sauren Block (AS 69-78) wird angenommen, daß er mit der Heparin-Bindestelle von HCII in Abwesenheit von GAGs interagiert, da die Entfernung von sauren Aminosäuren aus diesem Bereich zu einer deutlichen Steigerung der HCII-Affinität für Heparin führt. Zudem wird die HCII-Aktivität in der Abwesenheit von GAGs gesteigert. Mutationen im ersten sauren Block (AS 53-64) haben nur wenig Einfluß auf die Heparin-Affinität. Diese Ergebnisse passen auch zu der antiparallelen Anordnung des N-Terminus und der GAG-Bindestelle, wie in Abbildung 8 gezeigt.

Dem ersten sauren Block von HCII (AS 53-64) wird eine größere Bedeutung bei der Interaktion mit der Thrombin-Exosite I zugesprochen, da seine Entfernung weitgehend die Fähigkeit zur GAG-stimulierten Hemmung von Thrombin zerstört. Die zusätzliche Entfernung des zweiten sauren Blockes hat nur eine geringfügige Steigerung dieses Effektes zur Folge⁴.

¹ Sheehan *et al.* 1994, Liaw *et al.* 1999

² Danielsson *et al.* 1986

³ Ragg *et al.* 1990 b, Wemhoff & Church 1999

⁴ van Deerlin & Tollefsen 1991

Das vorgeschlagene Modell zur Aktivierung von HCII durch GAGs wird durch zahlreiche indirekte Hinweise unterstützt:

Bei Varianten von Thrombin, bei denen die Exosite I fehlt oder inaktiviert ist, kommt es zu keiner wesentlichen Steigerung der Inhibition durch HCII bei Zugabe von GAGs¹. Die Reaktionsgeschwindigkeit entspricht in ihrer Größenordnung etwa der in Abwesenheit von GAGs.

Bei intaktem Thrombin wurde gezeigt: a), daß ein C-terminales Peptid von Hirudin, von dem bekannt ist, daß es an Exosite I bindet, konzentrationsabhängig die Inaktivierung von Thrombin durch HCII in der Gegenwart von GAGs stört² und b), daß ein synthetisches Peptid, das den aminoterminalen Aminosäuren 54-75 von HCII entspricht, denselben Effekt hat und mit Hirudin um die Bindung an Thrombin Exosite I konkurriert³. Zudem wurde beschrieben, daß es nur an Exosite I von Thrombin bindet und die Bindung von Fibrin an diese Stelle stört, es aber keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität des reaktiven Zentrums hat.

Umgekehrt wurde gezeigt, daß Deletionen bzw. Mutationen der sauren Aminosäuren im N-Terminus von HCII ebenfalls bewirken, daß die Reaktion von HCII mit Thrombin nur noch unwesentlich durch GAGs stimuliert werden kann und mit einer Reaktionsgeschwindigkeit abläuft, die in etwa derjenigen in Abwesenheit von GAGs entspricht⁴.

Die Deletion des N-Terminus mit den beiden sauren Blöcken von HCII führt zudem zu einem deutlichen Anstieg der Affinität von HCII gegenüber Heparin-Sepharose⁵. Dies spricht für eine gegenseitige Beeinflussung von GAG-Bindestelle und N-Terminus in Abwesenheit von GAGs.

Ein Austausch von fünf basischen Aminosäuren in der GAG-Bindestelle gegen neutrale bewirkt, daß HCII eine 130-fach höhere Aktivität in der Abwesenheit von GAGs hat als Wildtyp-HCII, und daß durch Zugabe von GAGs keine wesentliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr erreicht werden kann⁶.

Zudem haben zahlreiche Arbeiten gezeigt, daß die Mutation von basischen Aminosäuren der GAG-Bindestelle zu einer verminderten Reaktionsgeschwindigkeit zwischen HCII und Thrombin in der Gegenwart von Heparin und/oder Dermatansulfat führt⁷.

Eine direktere Untersuchung über die Interaktion von N-Terminus und GAG-Bindestelle wurde bisher jedoch nicht beschrieben und soll in dieser Arbeit durchgeführt werden (siehe Zielsetzung der Arbeit Seite 25).

Anhand eines synthetischen Peptids bestehend aus den Aminosäuren 165 bis 195 von HCII, das die GAG-Bindestelle enthält, konnte gezeigt werden, daß sich der α -helicale Anteil dieses Bereiches von 7% ohne GAGs auf 32% bei Heparinzugabe bzw. 55% bei Dermatansulfat-Zugabe erhöht⁸. Die Konformationsänderungen, die bei der Anlagerung von GAGs an die GAG-Bindestelle einer HCII-Mutante mit einer Deletion der ersten 74 Aminosäuren stattfinden, scheinen aber keinen Einfluß auf die Konformation der reaktiven Schleife dieser Mutante zu haben, da durch Dermatansulfat-Zugabe keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Thrombin erreicht werden konnte⁶. Die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Heparin bei dieser Mutante dürfte auf den "template"-Effekt des Heparins zurückgeführt werden.

¹ van Deerlin & Tollefsen 1991, Phillips *et al.* 1993, Sheehan *et al.* 1994, Myles *et al.* 1998

² van Deerlin & Tollefsen 1991, Liaw *et al.* 1999

³ Hortin *et al.* 1989

⁴ Ragg *et al.* 1990 a & b, van Deerlin & Tollefsen 1991, Sheffield & Blajchman 1995, Liaw *et al.* 1999, Colwell *et al.* 1999, Wemhof & Church 1999, Baumann & Church 1999, Hayakawa *et al.* 2000 a

⁵ Ragg *et al.* 1990 a, van Deerlin & Tollefsen 1991, Liaw *et al.* 1999, Bauman & Church 1999, Böhme 2001

⁶ Liaw *et al.* 1999

⁷ Ragg *et al.* 1990 a & b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991, Liaw *et al.* 1999, Colwell *et al.* 1999

⁸ Whinna & Church 1994

Zum Vergleich soll kurz auf die Aktivierung von AT durch Heparin hingewiesen werden: Die GAG-Bindestelle von AT beschränkt sich nicht nur auf die α -Helix D, sondern beinhaltet insgesamt sieben wichtige basische Aminosäuren, die sich neben der α -Helix D noch im N-terminalen Bereich, der α -Helix A und im β -Faltblatt A befinden¹. Die Bindung von Heparin führt zu Konformationsänderungen, die wesentliche Teile des Moleküls betreffen². Zusätzlich ändert sich die Konformation der reaktiven Schleife von einer partiellen Insertion in das β -Faltblatt A zur vollen Exposition.

Neben Heparin, Heparansulfat und Dermatansulfat aktivieren zahlreiche andere Polyanionen wie Polysulfate, Fucoidan, Dextransulfat, Pentosan-Polyphosphate und Polycarbonate die Inhibition von Thrombin durch HCII³.

Außer dem beschriebenen Aktivierungsmechanismus durch GAGs gibt es Hinweise dafür, daß sulfatierte Polysaccharide aus Pflanzen bzw. Algen ohne Beteiligung der Heparin- oder der Dermatansulfat-Bindestelle und ohne Freisetzung des N-Terminus die Inhibition von Thrombin durch HCII stimulieren können⁴. Am Beispiel von Calcium-Spirulan⁵ wurde gezeigt, daß a) Lys173 und Arg189, wichtige Aminosäuren für die Aktivierung durch Heparin bzw. Dermatansulfat, mutiert werden können, ohne daß dies einen Einfluß auf die Hemmung von Thrombin hat, und daß b) eine HCII-Mutante, welcher der N-Terminus mit beiden sauren Blöcken fehlt, Thrombin in der Gegenwart von Ca-Spirulan ebenso effektiv inhibiert wie Wildtyp-HCII.

B.5.3 Physiologie

Hauptsyntheseort von HCII ist die Leber⁶, von wo aus HCII ins Plasma sezerniert wird. Neben der Leber konnten HCII-mRNAs mittels RT-PCR auch in Lunge, Herz, Niere, Plazenta und Gehirn nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringeren Mengen⁷.

Die Plasmakonzentration von HCII beträgt ca. 90 $\mu\text{g/ml}$ (1,37 μM)⁸. HCII liegt damit etwa im molaren Verhältnis von 1:1 mit Prothrombin vor. Ein wesentlicher Anteil liegt jedoch in nicht zirkulierender Form mit Gefäßwänden assoziiert vor oder befindet sich im extrazellulären Raum. Im Kaninchenmodell wurden ca. 80 % des Inhibitors als nicht zirkulierendes HCII detektiert, ein größerer Anteil als bei AT (ca 70%)⁹. Ein "Turn-over-Experiment" mit markiertem HCII am Menschen zeigte, daß ca. 40% des HCII extravaskulär verteilt sind¹⁰. Die Gewebeverteilung von HCII und AT weist deutliche Unterschiede auf⁷. HCII dominiert gegenüber AT in der Plazenta, wohingegen mehr AT in der Leber vorhanden ist. HCII und AT können ebenfalls in Lunge, Herz und Niere nachgewiesen werden, jedoch kaum im Gehirn.

Die Halbwertszeit von HCII im Plasma beträgt beim Menschen ca. 2,5 Tage, im Kaninchenmodell wurde eine Halbwertszeit von 1,6 Tagen bestimmt¹¹.

HCII-Thrombinkomplexe werden sehr viel schneller von der Leber aus dem Plasma entfernt, die Halbwertszeit liegt hier etwa bei zehn Minuten. Als Rezeptoren für Enzym-Serpin-

¹ Ersdal-Badju *et al.* 1997

² Skinner *et al.* 1997, Pike *et al.* 1997, Jin *et al.* 1997

³ Gettins 1996 *et al.*, Colwell *et al.* 1999

⁴ Hayakawa *et al.* 1996, Hayashi *et al.* 1997, Hayakawa *et al.* 2000 a & b

⁵ Hayakawa *et al.* 1996, Hayakawa *et al.* 2000 a

⁶ Jaffe *et al.* 1985, Ragg 1986, Ragg & Preibisch 1988, Zhang *et al.* 1994

⁷ Kamp *et al.* 2001

⁸ Tollefsen *et al.* 1982

⁹ Hatton *et al.* 1997

¹⁰ Sié *et al.* 1985 b

¹¹ Sié *et al.* 1985 b, Hatton *et al.* 1997

Komplexe wurden der **very-low-density-lipoprotein-receptor** (VLDLR) und das **low-density-lipoprotein-receptor-related protein** (LRP) identifiziert¹.

Die physiologische Funktion von HCII ist bislang nur unvollständig verstanden. HCII-Thrombin-Komplexe wurden sowohl im Plasma², als auch in der Plazenta und, jedoch in deutlich geringeren Mengen, in Lunge und Niere nachgewiesen³. In der Plazenta inhibiert HCII etwa gleich große Mengen Thrombin wie AT, wohingegen im Plasma nur ca. $\frac{1}{5}$ soviel Thrombin durch HCII gehemmt wird wie durch AT⁴. Dies beweist, daß HCII ein physiologischer Inhibitor von Thrombin ist.

Auf der anderen Seite scheint die Bedeutung von HCII für die Wahrung der Haemostase in der Zirkulation geringer zu sein als die von AT⁵. In einer Veröffentlichung von 1999⁶ wurden zwei Schwestern beschrieben, die beide eine homozygote HCII-Defizienz besitzen, was zu HCII-Aktivitäten von nur ca. 10 % des Normalwertes führte. Bei einer der beiden Schwestern waren bis zum 34. Lebensjahr trotz thrombotischer Risikofaktoren (Schwangerschaften, chirurgische Eingriffe, Einnahme oraler Kontrazeptiva) keine Thrombosen aufgetreten. Die zweite Schwester hatte mehrere thrombotische Vorfälle durchlaufen. Bei ihr wurde allerdings zusätzlich eine heterozygote AT-Defizienz diagnostiziert. Zum Vergleich: Eine komplette AT-Defizienz ist bei Mäusen bereits im embryonalen Stadium letal⁷.

Der Zusammenhang zwischen HCII-Defizienz und Thrombosen ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Einige Arbeiten sehen einen Zusammenhang zwischen familiärer HCII-Defizienz und Thrombosen⁸. Epidemiologische Studien zeigen jedoch, daß heterozygote HCII-Defizienz unter gesunden Patienten ebenso häufig ist, wie unter Patienten mit thrombotischer Vorgeschichte⁹. Heterozygote HCII-Defizienz scheint demnach, wenn überhaupt, nur ein gering erhöhtes Thromboserisiko zu bewirken. HCII-Defizienzen manifestieren sich durch Thrombosen meist nur dann, wenn zusätzliche prothrombotische Defekte vorliegen, wie z.B. bei AT-, Protein C- oder Faktor V-Defizienz¹⁰.

In mehreren Arbeiten wurde jedoch bewiesen, daß HCII eine physiologische Funktion bei der Hemmung von Thrombin nach Gefäßschädigung hat. So wurde beispielsweise anhand eines Rattenmodells beschrieben, daß HCII an geschädigten Gefäßwänden die Bildung des Thrombus in konzentrationsabhängiger Weise am Ort der Läsion verlangsamt¹¹, jedoch ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit der Thrombinbildung zu haben. In einem Kaninchenmodell⁵ wurde dargestellt, daß HCII nach Verletzung der Aorta HCII-Thrombinkomplexe im Bereich der Gefäßschädigung bildet. In der nicht geschädigten Aorta findet sich nur unkomplexiertes HCII. Es wurde jedoch auch gezeigt, daß sich innerhalb der ersten Minute nach Läsionsauslösung ca. 2,8 mal soviel AT wie HCII im Bereich der Gefäßverletzung akkumulierte.

Bei AT-Defizienz wurde beschrieben, daß der Anteil an Thrombin, der durch HCII komplexiert wird, zunimmt¹². HCII kann AT in seiner antikoagulatorischen Wirkung jedoch nicht vollständig ersetzen¹³.

¹ Kounnas *et al.* 1996, Kasza *et al.* 1997

² Andersson *et al.* 1992, Liu *et al.* 1995, Andersson *et al.* 1996

³ Kamp *et al.* 2001

⁴ Liu *et al.* 1995

⁵ Hatton *et al.* 1999

⁶ Villa *et al.* 1999

⁷ Ishiguro *et al.* 2000

⁸ Sié *et al.* 1985 a, Tran *et al.* 1985, Simioni *et al.* 1990, Weisdorf & Edson 1991

⁹ Bernardi *et al.* 1996, Bertina *et al.* 1987, Toulon *et al.* 1991 a & b

¹⁰ Villa *et al.* 1999, Bernardi *et al.* 1996

¹¹ Yamanaga *et al.* 2000

¹² Liu *et al.* 1995

¹³ Griffith *et al.* 1983

Da HCII, ungleich AT, auch durch Dermatansulfat aktiviert wird, welches sich nur außerhalb des Lumens von Blutgefäßen befindet, wird angenommen, daß HCII seine Funktion als Thrombin-Inhibitor verstärkt im Gewebe ausübt bzw. unter Bedingungen, bei denen eine erhöhte Dermatansulfat-Konzentration vorliegt¹. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß in der Plazenta, die reich an Dermatansulfat-haltigen Proteoglykanen ist², etwa gleiche Mengen an Thrombin durch HCII und AT inhibiert werden³, wohingegen es im Plasma nur ca. $\frac{1}{5}$ ist. Zudem findet man im Blut von Schwangeren, in dem sich ein erhöhter Level an Dermatansulfat befindet⁴, auch vermehrt HCII und HCII-Thrombin-Komplexe⁵.

Erhöhte HCII-Plasma-Level finden sich außer bei Schwangerschaft auch bei der Einnahme oraler Kontrazeptiva, bei nephrotischem Syndrom und bei tiefer Venenthrombose⁶.

Erniedrigte HCII-Plasma-Level findet man bei Fehlfunktion der Leber, bei Präeklampsie, bei Sichelzellanämie, bei Thalassämie, sowie bei HIV-Infizierten⁷.

Mehrere Veröffentlichungen lassen darauf schließen, daß HCII ein Akutphasen-Protein ist, d.h. seine Synthese durch Entzündungen gesteigert wird⁸. Es ist jedoch nicht gelungen, die Synthese von HCII in verschiedenen Hepatozyten-Zelllinien durch Entzündungszytokine zu stimulieren⁹. Ebenso konnte kein stimulierender Einfluß von Phorbol-ester oder ein inhibierender Einfluß von entzündungshemmender Salicylsäure auf die Produktion von HCII in der Leberzelllinie HepG2 nachgewiesen werden¹⁰.

Bei dem Versuch die physiologische Funktion von HCII zu verstehen, darf nicht vergessen werden, daß Thrombin neben der Spaltung von Fibrinogen noch zahlreiche zelluläre Effekte ausübt¹¹. Die Hemmung von Thrombin durch HCII dürfte auch darauf einen Einfluß haben, allerdings gibt es hierzu kaum Veröffentlichungen.

Interessanterweise haben, durch neutrophile Elastase abgespaltene aminotermine Peptide von HCII eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, was eine Funktion von HCII in der Entzündungsreaktion vermuten läßt¹².

Die durch Dermatansulfat katalysierte Inhibition von Thrombin durch HCII unterscheidet sich gegenüber der Heparin-katalysierten Reaktion dadurch, daß Dermatansulfat aktiviertes HCII in der Lage ist, Thrombus-gebundenes Thrombin zu inaktivieren¹³. Die Heparin-katalysierte Reaktion, ebenso wie die Inhibition von Fibrin-gebundenem Thrombin durch AT ist stark verlangsamt¹⁴. Dermatansulfat ist damit eine sinnvolle Ergänzung ggf. Alternative zur Verwendung von Heparin als Antikoagulant zur Verhinderung bzw. Therapie von Thrombosen¹⁵.

¹ McGuire & Tollefsen 1987

² Delorme *et al.* 1998

³ Kamp *et al.* 2001

⁴ Andrew *et al.* 1992

⁵ Liu *et al.* 1995, Andersson *et al.* 1996

⁶ Liu *et al.* 1995, Andersson *et al.* 1996, Massouh *et al.* 1989, Mackie *et al.* 1990, Toulon *et al.* 1992, Toulon *et al.* 1991 b

⁷ Tollefsen & Pestka 1985, Bellart *et al.* 1998, Chitolie *et al.* 1996, Toulon *et al.* 1993

⁸ Sandset & Andersson 1989, Toulon *et al.* 1991 b; Kario *et al.* 1992

⁹ Koike *et al.* 1996

¹⁰ Hellweg 2000

¹¹ Goldsack *et al.* 1998

¹² Hoffman *et al.* 1989, Church *et al.* 1991

¹³ Bendayan *et al.* 1994

¹⁴ Becker *et al.* 1999

¹⁵ Agnelli *et al.* 1992, Brister *et al.* 1994, Di Carlo *et al.* 1999

B.6 Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Proteoglykane sind Makromoleküle, die sich aus einem Kern (core)-Protein bestehen, an das Glykosaminoglykan-Ketten kovalent gebunden sind. Die Glykosaminoglykane (GAGs) selber sind saure unverzweigte Polymere aus sich wiederholende Disaccharideinheiten, von denen eine Saccharideinheit immer ein Aminozucker ist. Als Aminozucker treten D-Glucosamin oder D-Galactosamin auf, als zweite Zuckereinheit Hexuronsäuren (D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure) oder Galactose, die unterschiedliche Sulfatisierungen aufweisen.

Die GAGs lassen sich in drei Gruppen unterteilen¹:

- **G**lucosaminoglykane, bestehend aus einer Hexuronsäure und D-**G**lucosamin. Die Gruppe unterteilt sich in Heparansulfat und Heparin.
- Galactosaminoglykane, bestehend aus einer Hexuronsäure und D-Galactosamin. Die Gruppe unterteilt sich in Chondroitinsulfat und Dermatansulfat.
- Keratansulfat bestehend aus Galactose und D-Glucosamin. Auf diese Gruppe wird nicht näher eingegangen.

Heparin und Heparansulfat werden beide ausgehend von einem Polymer aus $[D\text{-Glucuronsäure} \xrightarrow{\beta 1,4} N\text{-Acetyl-D-Glucosamin} \xrightarrow{\alpha 1,4}]_n$ synthetisiert. Dieses Polymer durchläuft komplexe Modifikationen aus N-Deacetylierungen, N-Sulfatierungen, Epimerisierungen von D-Glucuronsäure zu L-Iduronsäure und verschiedene O-Sulfatierungen. Die entstehenden Produkte sind hoch variabel. Generell gilt, daß Heparin mehr N- und O-Sulfatgruppen und einen höheren Anteil an Iduronsäure enthält als Heparansulfat, welches mehr N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glucuronsäure enthält. Der Übergang zwischen Heparin und Heparansulfat ist jedoch fließend, weshalb es sinnvoll erscheint den Begriff Heparin für Glucosaminoglykane zu reservieren, die von Mastzellen produziert werden und alle anderen Glucosaminoglykane als Heparansulfat zu bezeichnen.

Galactosaminoglykane werden beginnend von einem linearen Disaccharidpolymer aus $[D\text{-Glucuronsäure} \xrightarrow{\beta 1,3} N\text{-Acetyl-D-Galactosamin} \xrightarrow{\beta 1,4}]_n$ synthetisiert. Das N-Acetyl-D-Galactosamin bleibt zwar acetyliert, es kommt jedoch auch hier zu Hexuronsäure-Epimerisierung und diversen O-Sulfatierungen, so daß auch Galactosaminoglykane hoch variabel sind. Per Definition besitzt Chondroitinsulfat keine Iduronsäure, wohingegen alle Iduronsäure-haltigen Galactosaminoglykane als Dermatansulfat bezeichnet werden.

Die biologischen Funktionen von Proteoglykanen sind ebenfalls sehr variabel². Sie reichen von simplen mechanischen Funktionen bis zu Beteiligungen an zahlreichen komplexen Funktionen wie Gewebeorganisation, Zellwachstum, Reifungsvorgängen von Geweben, biologischen Filtern, Modulation der Aktivität von Wachstumsfaktoren, Regulation der Blutgerinnung, Regulation der Kollagen-Fibrillogenese, Einfluß auf Tumorwachstum und Invasion u.v.m.

Proteoglykane sind ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) von Zellen. Die ECM umgibt Zellen und füllt die meisten extrazellulären Hohlräume. Sie ermöglicht so einerseits die Zellverankerung, andererseits können über sie Signale für Bewegung, Wachstum und Zelldifferenzierung vermittelt werden. Neben Proteoglykanen sind u.a. Kollagen, Elastin, Hyaluronsäuren und Fibronectin wichtige Bestandteile der ECM.

¹ Kjellén & Lindahl 1991

² Iozzo 1998

Das Vorkommen der für HCII und AT wichtigen GAGs Heparin, Heparansulfat und Dermatansulfat zeigt deutliche Unterschiede. Heparin ist zwar ein klinisch wichtiges Antikoagulant, sein natürliches Vorkommen in sekretorischen Granula von Mastzellen dient jedoch der Regulation bei Entzündungsvorgängen und immunologischen Reaktionen und nicht der Regulation der Gerinnung¹. Das Vorkommen von Dermatansulfat ist auf Bereiche außerhalb des Lumens von Blutgefäßen beschränkt. Ebenso kommen Dermatansulfat-Proteoglykane in Haut, Knochen und Knorpel vor. So produzieren beispielsweise Fibroblasten und glatte Muskelzellen Dermatansulfat-haltige Proteoglykane². Heparansulfat-Proteoglykane kommen neben dem extravaskulären Raum auch auf der Lumenseite von Gefäßen vor³.

Die Heterogenität der GAGs hat eine relevante Bedeutung für die Funktion von HCII und AT. So wird AT durch eine spezielle Pentasaccharidsequenz aktiviert, die nur in ca. 4% der Heparin- und weniger als 4% der Heparansulfat-Sequenzen vorkommt⁴. Die Reaktion von HCII mit Heparin und Heparansulfat benötigt keine bestimmte Saccharidsequenz, sondern erfolgt vorwiegend durch die Akkumulation negativer Ladungen⁵. Die Aktivierung durch Dermatansulfat geschieht bei HCII durch ein bestimmtes Hexasaccharidmotiv⁶, welches in ca. 2% der Dermatansulfat-Polymere vorkommt.

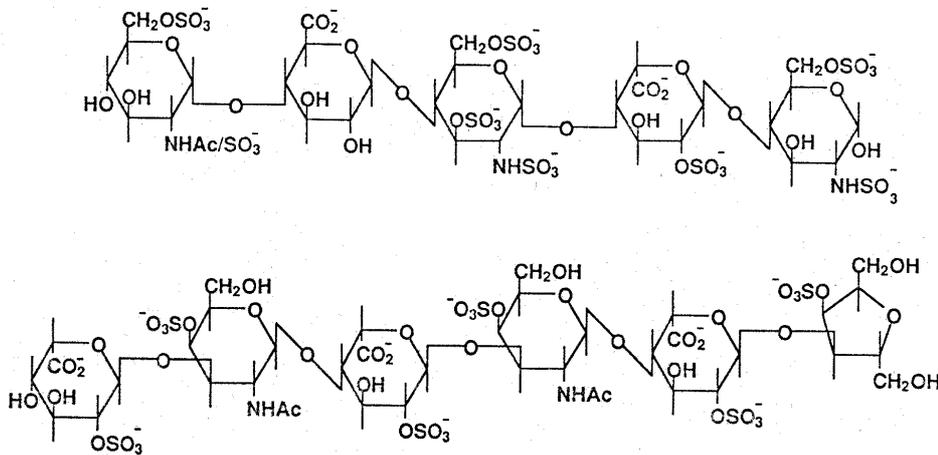


Abbildung 9: oben: Heparin-Pentasaccharid-Fragment, das mit hoher Affinität an AT bindet.
 unten: Dermatansulfat-Hexasaccharid, das mit hoher Affinität an HCII bindet.

¹ Zehnder & Galli 1999

² Mc Guire & Tollefsen 1987, Hiramoto & Cunningham 1988, Whinna *et al.* 1993

³ de Agostini *et al.* 1990, Shirk *et al.* 1996,

⁴ Lindahl *et al.* 1984

⁵ Hurst *et al.* 1983

⁶ Maimone & Tollefsen 1990

C Zielsetzung der Arbeit

Für das Modell der allosterischen Aktivierung von HCII durch GAGs, nach dem der saure Hirudin-ähnliche N-terminale Bereich des HCII-Moleküls eine Positionsänderung durchläuft, gibt es bislang vorwiegend indirekte Hinweise. Die in Abschnitt B.5.2 aufgeführten Literaturdaten zeigen jedoch drei Eckpunkte, die für die Aktivierung von HCII durch GAGs von essentieller Bedeutung sind:

- 1) Der saure N-Terminus von HCII interagiert nach HCII-Aktivierung durch GAGs mit Exosite I von Thrombin¹.
- 2) Die Aktivierung von HCII durch GAGs erfolgt über die GAG-Bindestelle und überträgt sich auf den sauren N-Terminus. Mutationen innerhalb der GAG-Bindestelle betreffen auch die, durch den N-Terminus vermittelte Reaktion mit Thrombin².
- 3) N-Terminus und GAG-Bindestelle beeinflussen sich auch in Abwesenheit von GAGs, da eine Deletion des N-Terminus zu einer deutlichen Steigerung der apparenten HCII-Affinität gegenüber Heparin führt³.

Die in der Literatur beschriebenen Vorarbeiten sprechen somit klar für eine gekoppelte Interaktion zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus bei der HCII-Aktivierung durch GAGs. Dem Modell nach, welches durch zahlreiche Vorarbeiten indirekt unterstützt wird, geschieht dies über eine Positionsänderung des N-Terminus gegenüber dem Moleküllern.

Ein direkterer Hinweis für diese gekoppelte Positionsänderung des N-Terminus steht bislang jedoch aus. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Vorgang der Aktivierung von HCII durch GAGs und den Einfluß auf den N-Terminus näher zu untersuchen. Dies soll dadurch geschehen, daß zwei Codons der cDNA von HCII in geeigneten Positionen zu Codons für Cysteine mutiert werden. Zwischen diesen beiden Cysteinresten soll sich eine Disulfidbrücke ausbilden, die den sauren N-Terminus von HCII kovalent mit dem Kern des Moleküls verknüpft.

Das Funktionsprinzip der einzubauenden Disulfidbrücke ist in Abbildung 10 dargestellt:

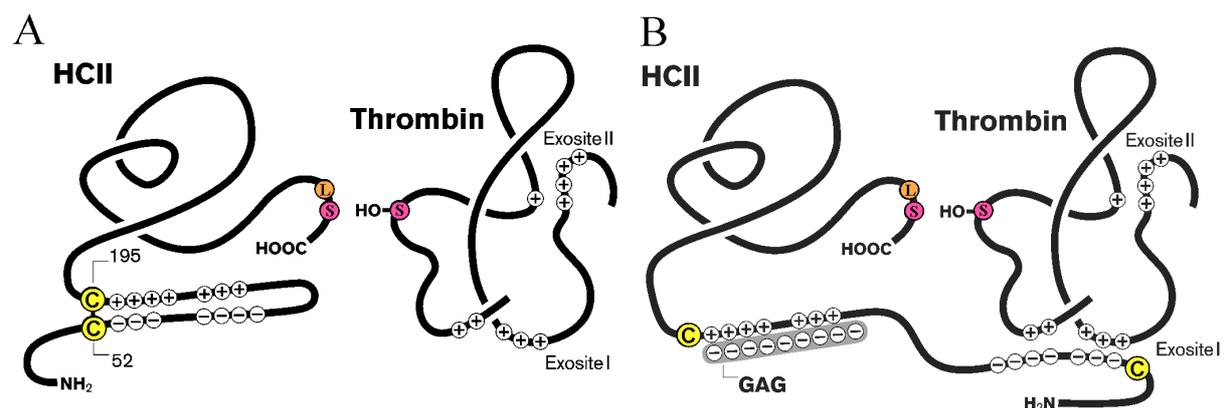


Abbildung 10 Funktionsweise der neu ins HCII einzufügenden Disulfidbrücke.

A) Thrombininhibition bei geschlossener Disulfidbrücke, B) Thrombininhibition bei reduzierter Disulfidbrücke

¹ Hortin *et al.* 1989, van Deerlin & Tollefsen 1991, Phillips *et al.* 1993, Sheehan *et al.* 1994, Myles *et al.* 1998, Liaw *et al.* 1999

² Ragg *et al.* 1990 a & b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991, Liaw *et al.* 1999, Colwell *et al.* 1999

³ van Deerlin & Tollefsen 1991, Liaw *et al.* 1999, Böhme 2001

Bei geschlossener Disulfidbrücke (Teil A) ist der N-Terminus von HCII kovalent am Kern des Moleküls fixiert. Auch bei Anwesenheit von GAGs kann er durch diese nicht verdrängt werden. Dies bedeutet, daß die postulierte Positionsänderung gegenüber dem Kern des Moleküls nicht stattfinden kann und daß der N-Terminus von HCII dadurch nicht mit der Exosite I von Thrombin interagieren kann.

Die Reduktion, und damit Öffnung der Disulfidbrücke (Teil B), sollte die HCII-Variante wieder in die Lage versetzen durch GAGs allosterisch aktiviert zu werden und so Thrombin über die Interaktion mit Exosite I effektiv zu inhibieren.

Ein Ausbleiben der reaktionsbeschleunigenden Wirkung von GAGs auf die Hemmung von Thrombin bei geschlossener Disulfidbrücke und die Wiederherstellung dieses Effekts bei reduzierter, geöffneter Disulfidbrücke würde das Modell einer gekoppelten Positionsänderung des sauren N-Terminus von HCII gegenüber dem Kern des Moleküls bei der HCII-Aktivierung durch GAGs unterstützen.

D Material & Methoden

D.1 Material

D.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Begasungsbrutschrank, Modell 3336	Forma Scientific Inc.
DNA-Sequencer 1500	GATC
Electroporator Gene Pulser [®] II mit Capacitance Extender Plus	Bio-Rad
ELISA-Reader EL _x 808 Microplate Autoreader	Bio-Tec Instruments Inc.
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss
FPLC [®] -System	
Liquid Chromatography Controller LCC-501 Plus	Pharmacia
High Precision Pump P-500	Pharmacia
Mixer 24 V, 50-60 Hz, 5 MPa	Pharmacia
Conductivity Monitor	Pharmacia
Monitor UV-1	Pharmacia
FPLCdirector Software V1.1	Pharmacia
Fraktionssammler FRAC-100	Pharmacia
HiTrap [®] Affinitätssäule 5 ml, Heparin-Sepharose CL-6B	Pharmacia
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele	Werkstatt der technischen Fakultät
Hybridisierungsöfen OV2	Biometra
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf
Li-Cor DNA-Sequencer 4000	Li-Cor
Mikroskop Axiovert 25 C	Zeiss
Mikrowelle	Siemens
Milli-Q [®] -Anlage	Millipore
Pipetten	Bio-Rad, Eppendorf, Dunn, Gilson
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System / Blottingsystem	
Xcell II Mini-Cell Gelelektrophoresesystem	Novex
Xcell II Blot Module	Novex
Netzgerät Electrophoresis Power Supply PS 3002	Life Technologies
Netzgerät BIO-RAD Model 200/2.0	Bio-Rad
Schlauchpumpe FE 411	B. Braun
Schwenkschüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler Centromat [®] U	B. Braun
Spannungsgerät Desatronic 500/500	Desaga
Spectrophotometer UV-1602	Shimadzu
Technoflow Cleanbench 2F120-II GS	Integra Bioscience
Thermocycler	
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Thermocycler Progene	Thermo-Dux
Transilluminator 312 nm	Biometra
UV-Stratalinker 2400	Stratagene
Vortex Genie 2, G-560 E	Scientific Industries
Waagen:	
Analytische Waage A120S	Sartorius
Universalwaage U4800 P	Sartorius
Wasser-Schüttelbad 1083	GFL
Zentrifugen:	
Biofuge 28 RS	Heraeus
RC5C Sorvall-Zentrifuge, Rotoren: SS-34; GS-3	Sorvall Instruments, Du Pont
Tisch-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Vakuum-Zentrifuge BA-VC-300H, beheizbar	Bachhofer
Megafuge 1.0	Heraeus

D.1.2 Dokumentation

Produkt	Hersteller
CCD-Videokamera	MWG-Biotech
Entwickler D-19	Kodak-Pathé
Fixierer UNIFIX	Kodak-Pathé
GloScreen™ UV Conversion Screen	Stratagene
Hyperfilm ECL®	Amersham Pharmacia Biotech
Transilluminator (312 nm)	Biometra

D.1.3 Kits

Kit	Hersteller
BioCycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
DIG-Nucleic Acid Detection Kit	Boehringer Mannheim
Jetsorb DNA Gel Extraction Kit	Genomed
Lipofectamin Plus	Life Technologies
PCR-Script™ SK(+) Cloning Kit	Stratagene
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit	Bio-Rad
Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech

D.1.4 Enzyme

D.1.4.1 Restriktionsendonucleasen und Puffer

Enzym	Erkennungssequenz	vom Hersteller empfohlener Puffer	Hersteller
<i>AlwNI</i>	5' CAGNNN▼CTG 3'	4	New England Biolabs
<i>AocI</i>	5' CC▼TNAGG 3'	L	Boehringer Mannheim
<i>BamHI</i>	5' G▼GATCC 3'	M	Genecraft
<i>DraI</i>	5' TTT▼AAA 3'	4	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	5' G▼AATTC 3'	H	Genecraft
<i>HindIII</i>	5' A▼AGCTT 3'	B	Genecraft
<i>MscI</i>	5' TGG▼CCA 3'	4	New England Biolabs
<i>NcoI</i>	5' CCA▼TGG 3'	4	New England Biolabs
<i>NdeI</i>	5' CA▼TATG 3'	4	New England Biolabs
<i>NcoI</i>	5' CCA▼TGG 3'	4	New England Biolabs
<i>PflMI</i>	5' CCANNNN▼NTGG 3'	3 + BSA	New England Biolabs
<i>PstI</i>	5' CTGCA▼G 3'	3	New England Biolabs
<i>PvuII</i>	5' CAG▼CTG 3'	4	New England Biolabs
<i>RcaI</i>	5' T▼CATGA 3'	B	Boehringer Mannheim
<i>RsaI</i>	5' GT▼AC 3'	L	Boehringer Mannheim
<i>SalI</i>	5' G▼TCGAC 3'	<i>SalI</i> + BSA	New England Biolabs
<i>ScaI</i>	5' AGT▼ACT 3'	H	Boehringer Mannheim
<i>SmaI</i>	5' CCC▼GGG 3'	4	New England Biolabs
<i>SrfI</i>	5' GCCC▼GGGC 3'	universal buffer	Stratagene
<i>XhoI</i>	5' C▼TCGAG 3'	2 + BSA	New England Biolabs
<i>XmnI</i>	5' GAANN▼NNTTC 3'	2 + BSA	New England Biolabs

Die Spaltstellen der Restriktionsendonucleasen sind durch ein schwarzes Dreieck (▼) gekennzeichnet.

Die Inkubation erfolgt bei allen Restriktionsendonucleasen mit Ausnahme von *SmaI* (25 °C) bei 37 °C.

Komponente	Puffer									
	Konzentrationen in mM									
	A	B	L	M	H	1	2	3	4	<i>SaII</i>
Tris-Acetat	33	-	-	-	-	-	-	-	20	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50	-	10	50	-	10
Bis-Tris Propan-HCl	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
Magnesiumacetat	10	-	-	-	-	-	-	-	10	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10	10	10	10	-	10
Kaliumacetat	66	-	-	-	-	-	-	-	50	-
NaCl	-	100	-	50	100	-	50	100	-	150
Dithioerytol (DTE)	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-
Dithiothreitol (DTT)	0,5	-	-	-	-	1	1	1	1	1
β-Mercaptoethanol	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
pH-Wert bei 25°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5	7,0	7,9	7,9	7,9	7,9

Tabelle 3: Reaktionspuffer für Restriktionsendonucleasen (1-fach konzentriert)

BSA-Lösung (100-fach konz.): 100 µg/ml BSA

Stratagene universal buffer: Über die Zusammensetzung des Puffers werden vom Hersteller keine näheren Angaben gemacht.

D.1.4.2 weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
cloned <i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Klen Therm DNA-Polymerase	Genecraft
Klen Thermase Sequenase	Genecraft
Shrimps alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat	GATC
T4 DNA-Ligase	Genecraft
Thrombin aus Humanplasma 250U / 2910 NIH units/mg	Sigma (Best.-Nr. T-1063)
Trypsin (in Gebrauchslösung 1-fach konzentriert)	Sigma
Trypsin-EDTA (in Gebrauchslösung 1-fach konzentriert)	Sigma

cloned <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (10-fach)	Klen Therm DNA-Polymerase (10-fach)	Shrimps alkalische Phosphatase (10-fach)	T4 DNA-Ligase (10-fach)
Tris-HCl: 200 mM	Tris-HCl: 670 mM	Tris-HCl: 0,5 M	Tris-HCl: 600 mM
MgSO ₄ : 20 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 160 mM	MgCl ₂ : 50 mM	MgCl ₂ : 100 mM
KCl: 100 mM	MgCl ₂ : 35 mM	pH 8,5 bei 20 °C	Dithioerytol: 10 mM
Triton X-100: 1%(w/v)	BSA: 0,15% (w/v)		ATP: 10 mM
BSA: 1 mg/ml	pH 9,1 bei 25°C		pH 7,6
pH 8,8 bei 25 °C			

Tabelle 4: Reaktionspuffer für Enzyme

D.1.5 DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandards dienen zur Bestimmung von Fragmentlängen doppelsträngiger linearer DNA nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe D.2.4.3).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende DNA-Längenstandards verwendet:

- 1 kB DNA Leiter (LM X) der Firma Life Technologies. Der Längenstandard wird nachfolgend als "LM X" bezeichnet.
- DNA Molecular Weight Marker VIII der Firma Boehringer Mannheim. Der Längenstandard wird nachfolgend als "LM VIII" bezeichnet.

Die DNA-Längenstandards werden in 1-fach konzentriertem Auftragspuffer (siehe D.2.4.3) verwendet.

Abbildung 11 zeigt die DNA-Fragmente der verwendeten DNA-Längenstandards nach der Auftrennung in einem 2 % (w/v) Agarosegel.

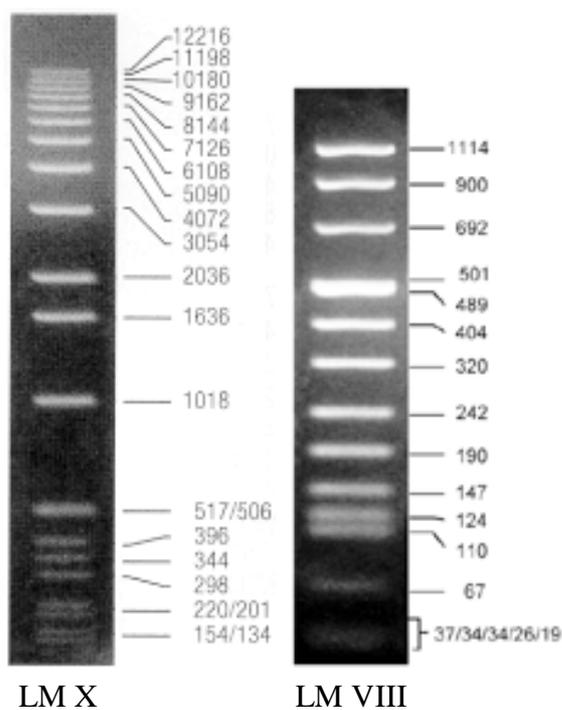


Abbildung 11: Darstellung der DNA-Fragmente der DNA-Längenstandards LM X und LM VIII (in Bp) nach Auftrennung in einem 2 % (w/v) Agarosegel.

D.1.6 Proteingrößenmarker

Proteingrößenmarker dienen zur Bestimmung der apparenten Größe von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe D.2.5.9).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Proteingrößenmarker der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet:

LMW-Größenmarker (LMW = <u>L</u> ow <u>M</u> olecular <u>W</u> eight)		HMW-SDS-Größenmarker (HMW = <u>H</u> igh <u>M</u> olecular <u>W</u> eight)	
Protein	Proteingröße in kDa	Protein	Proteingröße in kDa
Phosphorylase b	97	Myosin	220
BSA	66	α -2-Macroglobulin	170
Ovalbumin	45	β -Galactosidase	116
Carboanhydrase	30	Transferrin	76
Trypsin-Inhibitor	20,1	Glutamatdehydrogenase	53
α -Lactalbumin	14,4		

Abbildung 12 zeigt die Auftrennung der Markerproteine nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

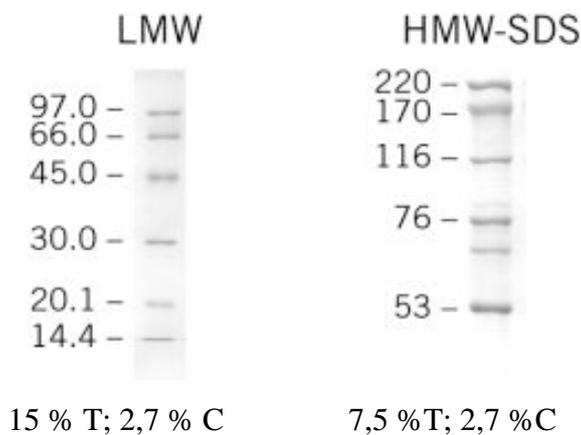


Abbildung 12: Darstellung der Proteinbanden der verwendeten Proteingrößenmarker nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. (Größenangaben in kDa)

D.1.7 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	Sigma	35-100 μ g/ml	100 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Carbenicillin	Roth	35-100 μ g/ml	50 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
G 418	PAA-Laboratories	600 μ g/ml	--
Kanamycin	Merck	40 μ g/ml	40 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Penicillin G	Biochrom	63 μ g/ml	6,3mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Streptomycinsulfat	Biochrom	100 μ g/ml	10 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20 °C
Tetracyclin	Merck	7,5 μ g/ml	5 mg/ml in Ethanol, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C

D.1.8 Primer

Primer	Sinn (+/-)	5' Startpunkt: bei Position *	Sequenz (5'→3')	besondere Eigenschaften
HC2/1813/-	-	1813	HO-GGG GCC TGG TGG AGA AAG GCT T	
HC2/Ala316/-	-	950	HO-TGC TGC GAG GAA GTT CCC CTT	
HC2/Cys195/-	-	600	HO-GCA GTG TGT ATC CAC AAT TCC TCC T	Mutation F195C Erzeugung einer stillen Mutation in Gly196 entfernt <i>RsaI</i> Schnittstelle
HC2/Cys52/+	+	141	HO-ACT AAC GAC TGG ATT TGT GAG GGG GAG GAG	Mutation P52C Erzeugung einer stillen Mutation in Thr47 entfernt <i>PfI</i> MI Schnittstelle
HC2/Cys52/-	-	170	HO-CTC CTC CCC CTC ACA AAT CCA GTC GTT AGT	komplementär zu HC2/Cys52/+
HC2/Cys54/+	+	141	HO-ACT AAC GAC TGG ATT CCA GAG TGT GAG GAG GAC GAC	Mutation G54C Erzeugung einer stillen Mutation in Thr47 entfernt <i>PfI</i> MI Schnittstelle
HC2/Cys54/-	-	176	HO-GTC GTC CTC CTC ACA CTC TGG AAT CCA GTC GTT AGT	komplementär zu HC2/Cys52/+
HC2/Cys68/+	+	198	HO-ATA TTT TGT GAA GAC GAC GAC TAC ATC	Mutation S68C Erzeugung einer stillen Mutation in Phe67 entfernt <i>XmnI</i> Schnittstelle
HC2/Cys68/-	-	225	HO-GAT GTA GTC GTC GTC TTC ACA AAA TAT	komplementär zu HC2/Cys 68/+
HC2/Glu228/+	+	684	HO-GAG GCC CAG ATA GCT GAC TTC T	
HC2/Glu429/+	+	1288	HO-AAG GCA CCC AAG CCA CCA CTG T	
HC2/Leu110/+	+	331	HO-TCA ACG CCA AGT TCG CTT TCA A	
HC2/Leu254/-	-	764	HO-GAG GCC CTT GGT GAG CTT CAT	
HC2/Lys391/-	-	1173	HO-TCA GGG ACT CCA CTA GAT TGT AG	
HC2/Ser273/2/+	+	810	HO-ATT CTC AAC TCC ATC TAC TTC AAA GGT TCC TGG GTG A	Mutation C273S Erzeugung einer stillen Mutation in Gly278 zerstört <i>BamHI</i> Schnittstelle
HC2/Ser273/2/-	-	846	HO-TCA CCC AGG AAC CTT TGA AGT AGA TGG AGT TGA GAA T	komplementär zu HC2/Ser273/2/+
HC2/Ser323/+	+	958	HO-AGG AGC TAG ACT CCG ACA TCC T	Mutation C323S / Erzeugung einer stillen Mutation in Leu321 entfernt <i>AlwNI</i> und <i>PfI</i> MI Schnittstellen
HC2/Ser467/+	+	1392	HO-CGC ACC AGC TCC CTG CTC TTC A	Mutation C467S Mutation zerstört gleichzeitig eine <i>PvuII</i> Schnittstelle
HC2/Ser467/-	-	1414	HO-TGA AGA GCA GGG AGC TGG TGC G	komplementär zu HC2/Ser467/+
NcoI-Gly1	+	(3)	HO-CCG GCG ATG GCC ATG <u>GGG AGC AAA GGC CCG CTG</u> <u>GAT</u>	NcoI Schnittstelle vor Basen 3 bis 23 der <i>HCII-cDNA</i> (Codons für Gly1 bis Asp7 im <i>HCII</i> Protein)
Dag 21	-	(201)	HO-GCG AAT <u>TCA</u> TAT CTT CTC CAG GTC CAG ATA GT	EcoRI Schnittstelle vor <i>HCII-cDNA</i> -Sequenz beginnend bei Base 201 im Codon für Phe67

Tabelle 5: HCII-spezifische Primer: Position und ihre Orientierung

* Die Nummerierung bezieht sich auf Ragg, H.: A new member of the plasma protease inhibitor gene family. *Nucleic Acids Res.* 1986, **14**: 1073–1088 (siehe hierfür H.1)

Primer	Sinn (+/-)	5' Startpunkt: bei Position *	Sequenz (5'→3')
HC2/1601+/IRD800	+	1601	IRD 800 AGA GAG GCT TGT TGG AAT CAA T
His-3+/IRD800	+	# (s.u.)	IRD 800-ACT CAT TAA ACG CAC TTC TCA TT
Leu110+/IRD800	+	331	IRD 800-CAA CGC CAA GTT CGC TTT CAA
Met344+/IRD800	+	1034	IRD 800-GTC TGG GAT GAA GAC CCT CG
Phe234+/IRD800	+	703	IRD 800-CTC AGA CCC TGC CTT CAT ATC

Tabelle 6: HCII spezifische Primer mit IRD800 Markierung für DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequencer 4000

* Die Nummerierung bezieht sich auf Ragg, H.: A new member of the plasma protease inhibitor gene family. *Nucleic Acids Res.* 1986, **14**: 1073 – 1088 (siehe hierfür H.1)

Das 5' Ende des Primers His-3+/IRD800 liegt in dem Codon der HCII-cDNA, welches für die Aminosäure in Position His3 des HCII-Signalpeptids codiert.

Die Primer wurden von den Firmen Life Technologies oder MWG-Biotech bezogen. IRD800-markierte Primer wurden ausschließlich von der Firma MWG-Biotech bezogen.

D.1.9 Bakerienstämme

Stamm	Genotyp	Lieferant
<i>E. coli</i> MC 1061/P3	F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 araΔ139, Δ(araABC-leu)7697, galU galK, rpsL (StrR) endA1 nupG {P3: KanR mpR (amber) TetR (amber)}	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F':Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/ rec A1 endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) glnV44 relA1 lac	Lehrstuhl für Genetik
<i>Epicurian coli</i> [®] XL1-Blue MRF ^r Kan	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn5 (Kan ^r)]	Stratagene

D.1.10 Zelllinien

Zelllinie	Lieferant
CHO DUKX B1 COS 7, CRL-1651, Batch F 13498	Dr. Karl Thomae GmbH American Type Culture Collection

D.1.11 Antikörper

Antikörper	Konzentration und Lagerung	Hersteller
monoklonaler Maus-anti-human-HCII IgG 2b, (188/2/1)	1,79 mg/ml in PBS; -80°C	Hoechst
monoklonaler Peroxidase gekoppelter Maus-anti-human-HCII IgG1 Antikörper, (92/2/12)	1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; -80°C	Hoechst
polyklonales anti-human-HCII-Antiserum Kan1 aus Kaninchen, Blutabnahmen 6 u.7	1:10 in PBS, -80°C	Hoechst
Anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelter IgG aus Esel	gelagert in PBS pH 7,5 1% (w/v) BSA, mit antimikrobiellem Zusatz (keine näheren Angaben des Herstellers), +4°C	Amersham Pharmacia Biotech

D.1.12 weitere Chemikalien und Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Agarose, Typ 15510-027	Life Technologies
Bacto-Tryptone	Difco
Blot-Membran Hybond P- PVDF	Amersham Buchler
Blotpapier	Schleicher & Schüll
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA) standard grade	Serva
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie R350-Färbetabletten	Pharmacia
Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B) aus Schweinemukosa	Sigma (Best.-Nr.C-3788)
Dialyseschlauch MWCO 12-14000 Daltons	Medicell International
4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid (DAPI)	Serva
Dulbecco's modified Eagle Medium (Pulver) (DMEM)	Life Technologies (Best.-Nr.: 31600-091)
ECL™ Western-Blotting Detektionsreagenzien	Amersham Pharmacia Biotech
Eosin	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
GATC Nylon Blottingmembran	GATC
Halbmikroküvettern Einwegware	Brand
Hefeextrakt	Difco
Heparin grade I-A (~ 170 USP units/mg) aus Schweinemukosa	Sigma (Best.-Nr. H-3393)
Humantransferrin	Life Technologies
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Hoechst
Lennox L Agar	Life Technologies
Lennox L Broth Base	Life Technologies
Maxisorb F96 Multititerplatten	Nunc
Methylenblau	Sigma
Microsept™ Mikrokonzentratoren (Cutoff 30 K)	Filtron
N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Nutrient Mixture Ham's F12	Life Technologies (Best.-Nr.: 21700-018)
Polyacrylamid-Gellösungen 19:1, 40 % (National Diagnostics), 30 % (GATC)	National Diagnostics/ GATC
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Pipettenspitzen	Alpha, Eppendorf
Rinderinsulin	Sigma
Roti-Phenol	Roth
Sequenator	GATC
Slide-A-Lyzer 3500 MWCO	Pierce
Standard-Humanplasma	Behring (Best.-Nr. ORKL 13)
Sterilfilter 0,2 µm Porendurchmesser	Sartorius
Trypanblaulösung	Sigma
belegte Brötchen	Eddi in der Uni
TMB Microwell Peroxidase System	Kickegaard & Perry Laboratory
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris-Base)	Roth
Tris-Glycin Gele 6%, 10 %, 14%, 1mm, 10 / 12 / 15 wells	Novex
Triton X-100	Serva
Tween 20	Serva
Xylencyanol	Sigma
Zellkulturgefäße	Nunc

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von p.A. Qualität und stammten von den Firmen Aldrich, Baker, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma.

D.1.13 Software

Software	Funktion	Hersteller
BaseImageIR V. 4.1	Auswertung von Licor Sequenzierungen	Li-Cor
Clone V.4.01	Konstruktion und Darstellung von Plasmidkarten	Scientific & Educational Software
FPLCdirector V.1.1	Steuerung der FPLC-Anlage und Dokumentation	Pharmacia
MicroWin V. 3.15	Steuerung des ELISA-Readers	Mirotech Laborsysteme
Oligo V.4.0 – 2004	Primerdesign	Wojciech Rychlik
Photo Finish Zsoft V.3.0	Verarbeitung und Dokumentation von CCD-Videokameradaten	WordStar Atlanta Technology Center®
Rasmol V2.5 und V2.6	Darstellung von pdb-Files	Roger Sayle
UV1602 V 3.5	Kinetische Messungen mittels Photometer	Shimatsu
WinCam V.2.2	Auswertung von Gelelektrophoresen / Densitomerie /Proteingrößenbestimmungen	Cybertech

D.1.14 Datenbanken

Datenbank	Verwendungszweck	Internet-Adresse
ClustalW	Alignment von DNA-Sequenzen	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
EMBL	DNA- und Protein-Datenbank	http://www.ebi.ac.uk/embl/
PeptideMass	Proteinspaltungen und Berechnung der Fragmentgrößen	http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html
Protein Data Bank (PDB)	3-D makromolekulare Strukturdaten	http://www.rcsb.org/pdb/
Swiss-Modell V1.1 und V 3.5	Protein Modelling	http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html
Webcutter 2.0	Restriktionsspaltung von DNA-Sequenzen und Suche nach Indikatormutationen	http://ccsi.com/firstmarket/cutter/cut2.html

Anmerkung

Im Laufe der Doktorarbeit änderten folgende Firmen ihren Namen bzw. wurden übernommen:

- Boehringer Mannheim: Übernahme durch Roche; neuer Firmenname: Roche Diagnostics
- Heraeus: Fusion mit Sorvall Instruments, Du Pont; neuer Firmenname: Kendro
- Hoechst: Fusion mit Rhône-Poulenc; neuer Firmenname: Aventis
- Pharmacia: Fusion mit Amersham Buchler; neuer Firmenname: Amersham Pharmacia Biotech
- Sorvall Instruments, Du Pont: Fusion mit Heraeus; neuer Firmenname: Kendro
- Novex: Übernahme durch Invitrogen

Im Abschnitt "Material & Methoden" ist jeweils der auf dem verwendeten Produkt angegebene Firmenname aufgeführt.

D.2 Methoden

D.2.1 Mikrobiologische Methoden

D.2.1.1 Medien für *E. coli*-Kulturen

Medien / Lösungen	Zusammensetzung
Lennox L Broth Base	50 % SELECT Peptone 140 25 % SELECT Hefe Extrakt 25 % NaCl
Lennox L Agar	33,3 % SELECT Peptone 140 16,6 % SELECT Hefe Extrakt 16,6 % NaCl 37,5 % SELECT Agar
LB-Flüssigmedium	20 g Lennox L Broth Base dH ₂ O ad 1 l
LB-Agar	37 g Lennox L Agar dH ₂ O ad 1 l
LB-Flüssigmedium & Amp	LB Flüssigmedium + 100 µg/ml Ampicillin
LB-Flüssigmedium & Carb & Tc	LB Flüssigmedium + 35 µg/ml Carbenecillin + 7,5 µg/ml Tetracyclin
LB-Agar & Amp	LB Agar + 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar & Carb & Tc	LB Agar + 35 µg/ml Carbenecillin + 7,5 µg/ml Tetracyclin
EMB-Stammlösung	3M KH ₂ PO ₄ 90 mM Eosin 25 mM Methylenblau
Laktose-IPTG-Lösung	585 mM Laktose 6,3 mM IPTG
EMB-LB-Agar & Amp	37 g Lennox L Agar +10 ml EMB Stammlösung dH ₂ O ad 950 ml + 50 ml Laktose-IPTG-Lösung + 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Flüssigmedium, pH 6,9	5 g Hefeextrakt 20 g Bactotryptone 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose dH ₂ O ad 1 l

Alle Medien werden bei 121°C für 30 Minuten autoklaviert, mit Ausnahme der Laktose-IPTG-Lösung und der Antibiotika-Stammlösungen (siehe D.1.7). Diese werden sterilfiltriert und den autoklavierten Medien erst bei einer Temperatur < 50°C zugesetzt.

D.2.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Kulturen

Bakterien werden mittels einer sterilen Pipette oder eines sterilen Zahnstochers auf Agarplatten (siehe D.2.1.1) aufgetragen. Ein sogenannter Einzelkoloniausstrich ermöglicht es, Bakterienkolonien zu erhalten, die aus einer einzelnen Bakterienzelle hervorgegangen sind. Die Inkubation des Bakterienausstrichs erfolgt bei 37°C ü.N. im Wärmeschrank. Die bewachsenen Platten können für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur werden 3 ml Flüssigmedium (siehe D.2.1.1) mit einer Einzelkolonie beimpft und ü.N. bei 37°C und 120 UpM auf einem Schüttler inkubiert.

Zur Anzucht größerer Bakterienmengen bis zu 100 ml Flüssigkultur erfolgt die Kultivierung in 1 Liter-Flaschen, für Volumen bis 250 ml im Schüttelkolben bei 200 UpM.

Das Wachstum der Bakterienkultur kann mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden. Als Referenz dient unbeimpftes Flüssigmedium.

Zur Langzeitlagerung werden Bakteriensuspensionen mit Glycerin auf eine Glycerinendkonzentration von 15 % (v/v) eingestellt und bei -80°C gelagert.

D.2.1.3 Transformation von Bakterienzellen ¹

Unter Transformation versteht man in der Bakteriengenetik die Übertragung von DNA in Bakterienzellen. Eine natürliche Kompetenz, d.h. die Fähigkeit Merkmale durch isolierte DNA zu übernehmen, kommt nicht nur bei *Streptococcus pneumoniae*, dem Bakterium, bei dem das Prinzip der Transformation entdeckt wurde² vor, sondern auch bei zahlreichen anderen Bakterienarten wie *Bacillus subtilis* oder Salmonellen. Der Grad der Kompetenz hängt vom physiologischen Zustand der Zelle ab. Sie ist in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase am höchsten, und sinkt danach rasch auf ein Minimum ab³.

E. coli besitzt kein natürliches System zur Aufnahme von DNA. Durch eine chemische Behandlung, beispielsweise mit CaCl₂, kann *E. coli* jedoch chemisch kompetent gemacht werden, d.h. in die Lage versetzt werden, DNA aufzunehmen.

D.2.1.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

50 ml LB-Flüssigmedium (siehe D.2.1.1) werden mit 1 ml einer *E. coli* MC1061/P3 oder *E. coli* XL 1-Blue ü.N.-Kultur beimpft und bei 37°C und 200 UpM auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 oder 0,9 inkubiert. 10 ml dieser Bakteriensuspension werden für 10 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen, das Pellet in 5 ml kaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut für 10 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem 50 mM CaCl₂ gelöst. Die Zellen bleiben bei Lagerung im Kühlschrank 1-2 Tage kompetent.

Epicurian Coli[®] XL1-Blue MRF' Kan wird bereits in chemisch kompetenter Form im PCR-Script™ SK(+) Cloning Kit geliefert. Nähere Angaben zur Herstellungsmethode werden vom Hersteller nicht gemacht.

¹ Mandel & Higa 1970

² Avery *et. al* 1944

³ Schlegel 1985

D.2.1.3.2 Transformation

Lösungen:

- TCM-Puffer, pH 7,5:	10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM CaCl ₂
- SOC-Flüssigmedium:	siehe D.2.1.1
- EMB-LB-Agar & Amp Platten:	siehe D.2.1.1
- LB-Agar & Carb & TC Platten:	siehe D.2.1.1

Zur Transformation von *E. coli* MC1061/P3 bzw. *E. coli* XL 1-Blue wird folgender Reaktionsansatz bei 0°C hergestellt:

- 200 µl kompetente Zellen (siehe D.2.1.3.1)
- 100 µl TCM-Puffer
- 1,0 µl 2-Mercaptoethanol
- 0,01 - 1,0 µg Plasmid-DNA oder 5 - 30 µl Ligationsprodukt

Der Transformationsansatz wird 1 Stunde auf Eis unter mehrfachem Invertieren inkubiert und anschließend für 3 Minuten einem Hitzeschock von 42,5°C im Wasserbad ausgesetzt. Nach Zugabe von 700 µl 37°C warmem SOC-Flüssigmedium wird der Transformationsansatz für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Anschließend werden verschiedene Volumina des Ansatzes auf antibiotikahaltige Selektiv-Agarplatten ausplattiert.

Für transformierte *E. coli* MC 1061/P3-Zellen wurden LB-Agarplatten & Carb & TC verwendet, da *E. coli* MC 1061/P3 ausschließlich mit Plasmiden transformiert wurde, die ein Derivat des Plasmids pCDM8 sind, welches Resistenz gegen Tetracyclin, Ampicillin und Carbenicillin vermittelt (siehe D.2.4.10). Für *E. coli* XL 1-Blue-Zellen wurden LB-Agarplatten & Amp verwendet.

Die Transformation in *Epicurian coli*[®] XL1-Blue MRF' Kan mit Derivaten des pCR-Script Amp SK(+) Vektors erfolgt entsprechend dem Protokoll des PCR-Script™ SK(+) Cloning Kit¹. Als Selektivmedium dienten EMB-LB-Agarplatten & Amp.

D.2.2 Zellkulturmethoden

Tierische und pflanzliche Zellen lassen sich unter geeigneten Bedingungen in Kultur halten und vermehren². Die Nutzung von Zelllinien bietet den Vorteil, daß diese Zellen, im Gegensatz zu den meisten primären Zellen, die nach einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen absterben, immortalisiert sind und sich unbegrenzt teilen können.

Mittels der Technik der Transfektion (siehe D.2.2.7) läßt sich fremde DNA in Zellen einbringen³ und exprimieren. Die Nutzung eukaryotischer Zellen für die Expression bietet den Vorteil, daß rekombinate eukaryotische Proteine durch das eukaryotische Proteinbiosynthesesystem in den meisten Fällen korrekt gefaltet werden und posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierungen durchlaufen.

¹ Stratagene Instruction Manual, 1994

² Han & McKeehan, 1979

³ Vaheri & Pagano, 1965

D.2.2.1 Medien und Lösungen für die Kultivierung tierischer Zellen

Medien / Lösungen	Zusammensetzung
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	10 g/l DMEM Fertigmedium 3,6 g/l NaHCO ₃ 0,47g/l L-Glutamin 3 g/l Glukose
100 x Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	630 mg Penicillin G 1000 mg Streptomycinsulfat dH ₂ O ad 100 ml
DMEM & Pen/Strep	DMEM + 1 % (v/v) 100 x Penicillin-Streptomycin
DMEM & Pen/Strep & 10 % FCS	DMEM & Pen/Strep + 10 % (v/v) FCS
DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans	DMEM & Pen/Strep + 10 mg/l Insulin + 10 mg/l Transferrin
Ham´s F12	10 g/l Nutrient Mixture F12 Ham 1,176 g/l NaHCO ₃ 1 % (v/v) 100 x Penicillin-Streptomycin 3,2 mM L-Glutamin 0,3 mM L-Prolin
Ham´s F12 & 10 % FCS	Hams F 12 + 10 % (v/v) FCS
ProCHO4-CDM	ProCHO4-CDM-Fertigflüssigmedium + 50 µM Hypoxanthin + 8 µM Thymidin 1 % (v/v) 100 x Penicillin-Streptomycin 3,2 mM L-Glutamin 0,3 mM L-Prolin
Einfriermedium	jeweiliges Kulturmedium + 10 % (v/v) DMSO
PBS-Puffer (phosphate buffered saline) pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 5,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Elektroporationspuffer pH 7,4 (<u>nicht</u> autoklavieren)	30,8 mM NaCl 120,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,46 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM MgCl ₂
Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in Gebrauchslösung
Trypsin-Lösung	2,5 g/l Trypsin in Gebrauchslösung
DAPI-Stammlösung (50-fach)	5 mg/ml in dH ₂ O
DAPI-Methanol-Lösung	200 µl DAPI Stammlösung Methanol ad 10 ml

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur mit Ausnahme von PBS-Puffer, DAPI-Stammlösung und DAPI-Methanol-Lösung werden mittels eines Sterilfilters sterilfiltriert. PBS-Puffer wird für 30 Minuten bei 121°C autoklaviert.

DAPI-Stammlösung und DAPI-Methanol-Lösung werden nicht sterilisiert.

D.2.2.2 Passagieren von Zellen

Wenn *in vitro* die Oberfläche der Zellkulturgefäße von adhärennten Zellen vollständig eingenommen wurde, spricht man von einer konfluenten Kultur. Für die weitere Expansion muß eine solche konfluente Kultur verdünnt werden.

Dieser Vorgang wird als Passagieren bezeichnet, d.h. die Zellen werden unter Verdünnen von alten Kulturgefäßen in neue überführt¹. Zum Ablösen der Zelle von der Oberfläche der Kulturgefäße werden die COS7-Zellen (siehe D.2.2.6) mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, CHO DUKX B1-Zellen (siehe D.2.2.8) mit Trypsin-Lösung. Beide Substanzen sind cytotoxisch und müssen nach Ablösung der Zellen von der Unterlage inaktiviert werden. Dies geschieht mit FCS-haltigem Medium.

Lösungen: Zusammensetzung siehe D.2.2.1

- PBS-Puffer
 - Trypsin-EDTA-Lösung
 - Trypsin-Lösung
 - FCS-haltiges Medium
- Alle Lösungen werden vor Verwendung auf 37°C temperiert.

Für das Passagieren wird der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen einmal mit dem gleichen Volumen PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird soviel Trypsin-haltige Lösung zugegeben, daß die Zellen gerade bedeckt sind. Danach werden die Zellen bei 37°C im Brutschrank solange inkubiert, bis sie sich durch leichtes Schwenken oder Stoßen an das Zellkulturgefäß von der Unterlage ablösen. Die vollständige Ablösung der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend werden die Zellen in FCS-haltigem Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue Zellkulturgefäße überführt.

D.2.2.3 Trypanblau-Ausschlußfärbung

Für die Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität werden adhärennte Zellen zuerst mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Unterlage abgelöst und in FCS-haltigem Medium resuspendiert (siehe D.2.2.2). Anschließend werden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl Trypanblaulösung gemischt und die Zellzahl lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt¹. Lebende Zellen erscheinen dabei farblos, da die intakte Zellmembran das Eindringen des Farbstoffs in die Zellen verhindert. Tote Zellen erscheinen blau.

¹ Lindl & Bauer 1994

D.2.2.4 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung¹ werden adhärenente Zellen zuerst durch Trypsinisieren von der Unterlage gelöst (siehe D.2.2.2), danach die Zellzahl bestimmt (siehe D.2.2.3) und anschließend bei 500 x g für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen mit einer Dichte von 10^5 bis 10^7 Zellen/ml in Einfriermedium (siehe D.2.2.1) aufgenommen. Die Langzeitlagerung erfolgt in Kryoröhrchen in der Gasphase eines Flüssigstickstofftanks bei -150°C bis -160°C .

Das Auftauen der Zellen erfolgt im Wasserbad bei 37°C . Anschließend werden die Zellen, um das cytotoxische DMSO zu entfernen, zu 8 ml FCS-haltigem Medium gegeben und für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in geeignetem Nährmedium resuspendiert und in Zellkulturgefäße überführt.

D.2.2.5 DAPI-Test auf Mycoplasmen

Mycoplasmen sind die kleinsten selbständig vermehrungsfähigen Prokaryoten. Sie besitzen keine Zellwand und haben eine Größe von $0,22 - 2,0 \mu\text{m}$. Die Größe des Genoms verschiedener Mycoplasmen entspricht nur einem Viertel des *E. coli*-Genoms. Sie haben damit das kleinste Genom von zur Autoreplikation befähigten Prokaryoten². Systematisch stellen die Mycoplasmen eine eigene Bakterienklasse dar, die Mollicutes (Weichhäutler).

Die geringe Größe der Mycoplasmen und das Fehlen einer festen Zellwand stellen ein Problem für die verwendeten Sterilisationsmethoden in der Zellkulturtechnik dar, da Mycoplasmen in der Lage sind die üblichen Sterilfilter, deren mittlere Porengröße um $0,2 \mu\text{m}$ beträgt, zu passieren.

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mycoplasmen sind häufig, sie sind lang andauernd und meist schwierig zu behandeln. Mycoplasmen bewirken nicht immer drastische Effekte und bleiben deshalb oft lange unentdeckt, obwohl sie vielfältig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen.

Kontaminationen mit Mycoplasmen lassen sich am einfachsten durch Anfärben der Mycoplasmen-DNA mit dem an DNA bindenden Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) nachweisen³. Mycoplasmen erscheinen als gleichmäßig geformte helle Punkte oder Ansammlungen von solchen in befallenen Zellen. Mitochondriale DNA wird von DAPI kaum angefärbt, wohingegen der Zellkern und die DNA von Bakterien und Pilzen zwar angefärbt werden, aber sehr viel größer und anders geformt sind als Mycoplasmen, so daß sie problemlos zu unterscheiden sind.

Lösungen: Zusammensetzung siehe D.2.2.1

- PBS- Puffer
- DAPI-Methanol-Lösung

Für den Mycoplasmentest sollten die adhärenente Zellen eine Konfluenz von 50 – 70 % aufweisen. Der Zellkulturüberstand wird entfernt und die Zellen einmal mit PBS-Puffer und einmal mit DAPI-Methanol-Lösung gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit DAPI-Methanol-Lösung überschichtet und für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank gefärbt. Die Färbelösung wird entfernt und die Zellen mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen.

¹ Lindl & Bauer 1994

² Schlegel 1985

³ Russell *et al.* 1975

Der Nachweis der Mycoplasmen erfolgt mittels des Fluoreszenzmikroskops Axioskop und einem 100 x Ölimmersionsobjektiv. Als Filtersatz wird die Filterkombination UV-H365, BP 365/12, FT 395 und LP 397 verwendet. Das Fluorochrom wird dabei mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 488 nm.

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Befall mit Mycoplasmen untersucht.

D.2.2.6 COS-Zell System

Die Abkürzung COS steht für CV1 Oorigin SV40. Die verwendete Zelllinie COS7 (ATCC Nr: CRL-1651) leitet sich von der etablierten adhären wachsenden Zelllinie CV1 ab, einer Affen-Nierenzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze (african green monkey; *Cercopithecus aethiops*). Die Zelllinie wurden mit einer replikationsdefekten (origin defective) Mutante des Affentumorvirus SV40 (Simian Virus 40) transformiert¹, die u.a. für das T-Antigen codiert. Das T-Antigen ist zur Replikation der viralen DNA essentiell. Das Protein bindet u.a. an den viralen Replikationsursprung (origin of replication)². Das T-Antigen wird in COS-Zellen konstitutiv exprimiert, die Zellen produzieren jedoch keine Viruspartikel.

Das COS-System wird bevorzugt zur transienten Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. Hierfür werden meist sog. Schaukelvektoren verwendet, die in die Zellen transfiziert werden (siehe D.2.2.7). Neben den Elementen, die für die Replikation im bakteriellen System benötigt werden, besitzen die Vektoren noch einen SV40 Replikationsursprung. Mit Hilfe des von den COS-Zellen produzierte T-Antigen wird der Vektor in den Zellen bis zu einer Anzahl von ca. 100000 Kopien repliziert³. Das Fremdprotein befindet sich meist unter der Kontrolle eines starken Promotors wie beispielsweise dem pCMV-Promotor⁴ aus dem humanen Cytomegalovirus CMV .

Die Kultivierung der COS7 Zellen erfolgt adhären in Zellkulturgefäßen bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Partialdruck von 10%. Das DMEM-Zellkulturmedium wird, sofern die Zellen nicht durch Passagieren ausverdünnt werden (siehe D.2.2.2), alle 2-4 Tage gewechselt, um optimale Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten.

D.2.2.7 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die Untersuchung eukaryotischer Genregulation und die Expression von (rekombinanten) Proteinen stellt die Transfektion eine effiziente Methode dar, welche die Einführung und Expression von Nucleinsäuren in eukaryotische Zellen ermöglicht.

Neben den traditionellen Methoden der Transfektion wie DEAE-Transfektion⁵ und Calciumphosphat-Ko-Präzipitation⁶ kann DNA auch mittels kationischer Lipide⁷, man spricht von Lipofektion, oder durch physikalische Methoden wie Mikroinjektion⁸, Elektroporation⁹ oder Mikropartikeln¹⁰ in die Zelle eingebracht werden.

¹ Gluzman 1981

² Fanning & Knippers 1992

³ Mellon *et al.* 1981

⁴ Boshart *et al.* 1985, Foecking & Hofstetter 1986

⁵ Vaheri & Pagano 1965

⁶ Graham & van der Eb 1973

⁷ Felgner *et al.* 1987

⁸ Capecchi 1980

⁹ Neumann *et al.* 1982

¹⁰ Ye *et al.* 1990

Man unterscheidet zwischen stabiler und transienter Transfektion. Bei der stabilen Transfektion integriert die eingeschleuste DNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle. Dieser Vorgang findet jedoch nur mit geringer Effizienz statt. Zur Selektion stabil transfizierter Zelllinien muß zusätzlich ein Selektionsmarker wie das DHFR-Gen oder das G418-Resistenzgen eingebracht werden, über den stabil transfizierte Zellen über mehrere Zellteilungszyklen selektioniert werden können.

Bei der transienten Transfektion wird die Fremd-DNA nicht in das Genom integriert und die Fremd-DNA wird nur für einige Tage exprimiert.

Das geeignete Transfektionsverfahren muß individuell für eine spezielle Zelllinie ausgewählt und optimiert werden.

Die Konzentrationen der für die Transfektionen verwendeten DNA-Lösungen wurden nach Agarosegelelektrophorese (siehe D.2.4.3) densitometrisch ermittelt (siehe D.2.4.5.2).

D.2.2.7.1 Transiente Lipofektion von COS7-Zellen

Bei der Liposomen-vermittelten Transfektion wird die DNA mittels kationischer Lipide in die Zelle eingeschleust. Dabei interagiert die kationische Kopfgruppe des Lipids mit den negativ geladenen Phosphatresten der Nucleinsäure. Die DNA wird in multilamellaren Strukturen gebunden, die aus alternierenden Lipid-Doppelschichten (lipid bilayer) und DNA-Einzelschichten (DNA-monolayer) bestehen¹. Die Aufnahme der Liposomen in die Zelle erfolgt über Proteoglykan-vermittelte Endocytose².

Die Lipofektion der COS7-Zellen erfolgte mit dem Lipofectamin plus Kit der Firma Life Technologies. Bei Lipofectamin handelt es sich um ein Gemisch aus dem polyanionischen Lipid DOSPA (2-3-Dioleoyloxy-N[2sperminocarboxamido]ethyl]N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat) und dem neutralen Lipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) im Verhältnis 3:1 (w/w) in Wasser³. Beim "Plus"-Reagenz handelt es sich um ein sog. kationisches Enhancer Reagenz, durch welches die DNA auf kleinem Raum kondensiert werden kann, was ohne Enhancer aufgrund der gegenseitigen Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen nicht möglich wäre. Nähere Angaben über die Zusammensetzung werden vom Hersteller nicht gemacht.

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so ausverdünnt, daß sie am Tag der Lipofektion eine Konfluenz von 50 – 80 % haben. Für die Transfektion einer Zellkulturplatte mit einer Oberfläche von 8,8 cm² werden 0,4 – 0,6 µg sterile Plasmid-DNA in 100 µl FCS-freies Medium gegeben. Nach Zugabe von 6 µl Plus-Reagenz wird, vorsichtig gemischt und anschließend für 15 Minuten bei RT inkubiert. Parallel dazu werden 4 µl Lipofectamin in 100 µl FCS-freies Medium gegeben. Nach Ablauf der 15 Minuten werden die beiden Ansätze gemischt und für weitere 15 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Medium von den Zellen abgezogen, die Zellen werden zweimal mit FCS-freiem Medium gewaschen und mit 800 µl FCS-freiem Medium überschichtet. Die DNA-Lipofectamin-Plus-Lösung wird vorsichtig zu den Zellen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und der Ansatz für 2,5 bis 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Schließlich werden 2,0 ml DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans (siehe D.2.2.1) zugegeben. Der Zellkulturüberstand wird nach drei Tagen abgenommen und tote Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 x g entfernt.

¹ Radler *et al.* 1997

² Mislick & Baldeschwieler 1996, Friend *et al.* 1996

³ Hawley-Nelson *et al.* 1993

D.2.2.7.2 Elektroporation von COS7-Zellen zur transienten Produktion von rekombinantem HCII

Bei der Elektroporation werden suspendierte Zellen in ein Elektroporationsgefäß mit zwei Elektroden gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzfristig Poren in der Zellmembran, durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen können¹. Die Effizienz der Elektroporation ist abhängig von einer Reihe physikalischer und biologischer Faktoren:

- Feldstärke und Impulsdauer²
- Temperatur³
- Elektroporationsmedium⁴
- DNA-Konzentration, -Topologie und -Reinheit⁵

Die Elektroporationsparameter müssen für jede Zelllinie optimiert werden. Für die meisten Zelllinien werden Bedingungen gewählt, bei denen 20 – 50 % der Zellen den Elektroporationsvorgang überleben².

Für die Elektroporation von COS7-Zellen wurde ein Protokoll entwickelt, das auf den Methoden von Baum *et al.*, Blasey *et al.* und Cataldo *et al.*⁶ basiert.

Die beschriebenen Bedingungen wurden in Vorversuchen für das COS7-System optimiert. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Lösungen: Zusammensetzung siehe D.2.2.1

- PBS- Puffer
- Trypsin-EDTA-Lösung
- Elektroporationspuffer
- sterile Plasmid-DNA gelöst in Elektroporationspuffer
- DMEM & Pen/Strep & 10 % FCS
- DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans

Alle Lösungen werden auf Raumtemperatur temperiert.

Der nachfolgende tabellarische Ablauf ist für die Elektroporation von COS7-Zellen ausgelegt, die auf T-Zellkulturflaschen mit einer Kultivierungsoberfläche von 175 cm² (T175-Flaschen) gezüchtet werden.

- 1) Zellen einen Tag vor der Elektroporation ausverdünnen (siehe D.2.2.2), so daß sie sich am Tag der Elektroporation in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine Konfluenz von ca. 80 % aufweisen.
- 2) Zellen von 2 - 3 T175-Flaschen durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Unterlage ablösen (siehe D.2.2.2) und in insgesamt 50 ml DMEM & Pen/Strep & 10% FCS aufnehmen.

¹ Zimmermann & Vienken 1982

² Andreason & Evans 1988

³ Andreason & Evans 1989

⁴ Neumann *et al.* 1982

⁵ Boggs *et al.* 1986, Reiss *et al.* 1986, Chu *et al.* 1987, Sambrook *et al.* 1989

⁶ Baum *et al.* 1994, Blasey *et al.* 1996, Cataldo *et al.* 1998;

- 3) Zellen bei 500 x g für 5 Minuten bei RT abzentrifugieren, Überstand verwerfen und Zellen anschließend in 10 ml Elektroporationspuffer vorsichtig resuspendieren.
- 4) Zellzahl bestimmen (siehe D.2.2.3). Die Gesamtzellzahl sollte nicht kleiner als 2×10^7 sein.
- 5) Zellen erneut für 5 Minuten bei 500 x g abzentrifugieren und anschließend in insgesamt 400 µl Elektroporationspuffer vorsichtig aufnehmen.
- 6) 40 – 50 µg sterile Plasmid-DNA gelöst in Elektroporationspuffer zugeben und vorsichtig mischen. Die DNA-Menge ist unabhängig von der Zellzahl. Die DNA-Konzentration sollte nicht kleiner als 1 µg/µl sein. DNA-Zelllösung anschließend 5 Minuten auf Eis kühlen.
- 7) Elektroporation mit 260 V, 900 µF. Zellen anschließend erneut 5 Minuten auf Eis kühlen.
- 8) Zellen in 40 ml DMEM & Pen/Strep & 10 % FCS (siehe D.2.2.1) aufnehmen und in eine T175-Flasche geben.
- 9) Am nächsten Tag Medium wechseln und 50 ml DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans (siehe D.2.2.1) zugeben.

Die Produktionsphase dauert bis zu 6 Tage, wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wird. Tote Zellen werden aus dem gewonnenen Zellkulturüberstand durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 Minuten abzentrifugiert.

D.2.2.8 CHO Zellsystem

Der Name CHO steht für Chinese Hamster Ovary und stammt von einer Kultur, die im Jahre 1958 von Puck et al.¹ aus den Ovarien eines Goldhamsters (*Cricetulus griseus*) isoliert wurde. Die verwendete Zelllinie CHO DUKX B1 (ATCC Nr: CRL-9010) leitet sich von der Ursprungs-CHO-Zelllinie von 1958 ab, besitzt jedoch einige wichtige phänotypische Unterschiede, wie beispielsweise Defekte bei der Synthese von Prolin, Glycin, Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Thymidin². DHFR-defiziente CHO-Zelllinien werden oft für die Etablierung stabiler Zelllinien verwendet, bei denen Fremd-DNA stabil in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Hierfür wird meist das Zielgen zusammen mit einem Gen für Dihydrofolat-Reduktase in die Zellen transfiziert, was eine Koselektion und Koamplifikation mit Methotrexat ermöglicht³. Dabei fungiert DHFR als rezessiver Selektionsmarker. Neben dem DHFR-Methotrexat-System können zur Selektion auch das Aminoglykosid-Antibiotikum G418, welches die Funktion der eukaryotischen S80 Untereinheit der Ribosomen stört⁴ und das entsprechende Resistenzgen verwendet werden⁵.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden CHO-Zellen erfolgt bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei einem CO₂-Partialdruck von 5 %. Das Ham's F12 & 10 % FCS-Zellkulturmedium (siehe D.2.2.1) wird, sofern die Zellen nicht durch Passagieren ausverdünnung werden (siehe D.2.2.2), alle 2-4 Tage gewechselt.

¹ Puck et al. 1958

² Urlaub & Chasin 1980, Kurano et al. 1990

³ Urlaub & Chasin 1980, Ringold et al. 1981, Kaufman & Sharp 1982, Schimke 1988

⁴ Daniels et al. 1973

⁵ van Hove et al. 1996

D.2.2.8.1 Etablierung einer rekombinanten CHO DUKX B1 Zelllinie

Für die Etablierung einer stabil HCII-exprimierenden Zelllinie wurde das Plasmid pSBR21 (siehe D.2.4.10.3) in CHO DUKX B1 Zellen transfiziert. pSBR21 enthält die cDNA für die humane HCII-Variante HCII Δ C F195C/P52C unter der Kontrolle des pCMV-Promotors¹, der auch in CHO-Zellen effizient erkannt wird². Selektionsmarker ist das Resistenzgen³ gegen G418, welches sich ebenfalls auf dem Plasmid befindet. pSBR21 wurde, um eine willkürliche Öffnung des Plasmids bei der Integration ins Genom zu verhindern⁴, über die singuläre *ScaI* Schnittstelle linearisiert (siehe D.2.4.6), mit Kaliumacetat und Isopropanol gefällt (siehe D.2.4.4.5), in PBS resuspendiert, die Konzentration nach Agarosegelelektrophorese (siehe D.2.4.3) densitometrisch bestimmt (siehe D.2.4.5.2) und mittels Lipofection, wie im Abschnitt D.2.2.7.1 beschrieben, in die Zellen transfiziert. Als Kulturmedium nach der Transfektion wurde Ham's F12 & 10 % FCS (siehe D.2.2.1) verwendet.

Zur Selektion von stabil transfizierten Zellen wurden die Zellen ab dem zweiten Tag nach der Transfektion mit Ham's F12 Medium & 10 % FCS kultiviert, dem 600 μ g/ml G418 zugesetzt wurde. Diese G418-Konzentration hatte sich in Vorversuchen als ausreichend zur Abtötung nicht-transfizierter Zellen nach ca. einer Woche erwiesen (Ergebnisse nicht dargestellt). Zellen, die die Fremd-DNA nicht stabil in ihr Genom integriert haben, sterben ebenfalls nach einiger Zeit ab. Zur Kontrolle wurden nicht-transfizierte CHO DUKX B1 Zellen ebenfalls mit G418-haltigem Medium kultiviert. Drei Wochen nach der Transfektion wurden Einzelzellklone der transfizierten Zellen isoliert. Hierfür wurden die Zellen so stark ausverdünnt, daß deutlich von einander getrennte Kolonien entstanden, die jeweils aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen waren. Einzelne Kolonien wurden durch sterile, mit Silikonfett eingefettete Enden von Pipettenspitzen umschlossen und so räumlich vom Rest der Zellkulturschale getrennt. In dieser Abtrennung konnten die Kolonien durch Passagieren (siehe D.2.2.2) auf neue Zellkulturschalen überführt werden. Die einzelnen Klone wurden auf ihre HCII-Produktion mittels ELISA (siehe D.2.5.1) getestet. Die Arbeiten zur Selektion und Untersuchung von Einzelklonen wurden von Annemarie Strathmann durchgeführt.

In der AG zelluläre Genetik liegt zudem eine CHO DUKX B1-Zelllinie vor, in welcher die cDNA für humanes Wildtyp-HCII stabil ins Genom integriert ist⁵. Die Transfektion eines Plasmids, welches die HCII-cDNA enthielt, sowie eines zweiten Plasmids, welches eine Dihydrofolat-Reduktase-Genkassette enthielt, erfolgten mittels der Polybren-Methode⁶, Selektion und Koamplifikation erfolgten über das Methotrexat-DHFR-System⁷.

Für die Produktion von HCII wurden beide Zelllinien in T175-Flaschen mit DMEM & Pen/Strep & 10% FCS bis zu einer Konfluenz von ca. 95% - 100% kultiviert. Das FCS-haltige Medium wurde entfernt, die Zellen zwei mal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 ml DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans Medium (siehe D.2.2.1) überschichtet, dem 0,7 mg/l Thymidin zugesetzt wurde. Die Produktionsphase dauerte vier Tage.

¹ Boshart et al. 1985, Foecking & Hofstetter 1986

² Wernicke & Will 1992

³ Southern & Berg 1982

⁴ Invitrogen Manual 1999

⁵ Strathmann, Böhme, Ragg unveröffentlicht

⁶ Chaney et al. 1986

⁷ Urlaub & Chasin 1980, Ringold et al. 1981, Kaufman & Sharp 1981, Schimke 1988

D.2.3 Dreidimensionale Proteinmodellierungen

Für die Erstellung von dreidimensionalen Strukturmodellen von humanem HCII wurden die Versionen 1.1 und 3.5 des Swiss Model Servers (siehe D.1.14) der Glaxo Wellcome Experimental Research in Genf benutzt.

Swiss Model¹ extrapoliert ein Proteinstruktur-Modell für eine vorgegebene Proteinsequenz auf der Basis von 3D-Strukturen verwandter Proteine derselben Proteinfamilie. Für die Methode werden daher auch die Begriffe "modeling by homology" und "comparative model building" benutzt. Die Verlässlichkeit des errechneten Modells ist dabei um so größer, je höher die Homologie zwischen der zu modellierenden Proteinsequenz und den verwendeten Vorlagen ist².

Sofern keine 3D-Strukturen von "Template-Proteine" vorgegeben werden, sucht das Programm in der Protein Data Bank (PDB)³ (siehe D.1.14) nach verwandten Proteinen mit bekannten experimentell ermittelten 3D-Strukturen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein dreidimensionales HCII-Modell mit Version 1.1 des Swiss Model Servers modelliert, basierend auf Röntgenstrukturdaten der nachfolgend aufgelisteten Serpine. Zu diesem Zeitpunkt (Mai 1996) waren Röntgenstrukturdaten von ungespaltenen Serpinen mit Ausnahme von Ovalbumin nur von solchen Serpinen vorhanden, die im Übergang von Helix D und am Beginn von Strang 2 im β -Faltblatt A, verglichen mit HCII zusätzliche Aminosäuren oder Deletionen von Aminosäuren haben. Wie im Abschnitt E.1 dargestellt, wurde bei dieser Modellierung von HCII darauf Wert gelegt, daß nur Serpine zur Modellierung verwendet wurden, die keine Aminosäureinsertionen oder Deletionen hinter der Helix D gegenüber HCII aufweisen. Das einzige ungespaltene Serpin, dessen Struktur zur Modellierung zur Verfügung stand war Ovalbumin. Von allen anderen geeigneten Serpinen waren nur Strukturdaten der gespaltenen Proteine vorhanden, die in ihre Struktur erheblich von der jeweils ungespaltenen Form abweichen (siehe auch B.4.1).

Protein	Eigenschaften	PDB-Eintrag
Ovalbumin	ungespalten	1OVA ⁴
humanes α_1 -Antitrypsin	gespalten im reaktiven Zentrum, Aminosäuren 1- 11 fehlen	7API ⁵
humanes α_1 -Antichymotrypsin	gespalten im reaktiven Zentrum	2ACH ⁶
humaner Protein C Inhibitor	theoretisches Modell gespalten im reaktiven Zentrum	1PAI ⁷

Tabelle 7 : Verwendete Serpin-Strukturdaten aus der Protein Data Bank für die Modellierung von HCII 1996

Aufgrund der Vielzahl von weiteren Serpin-Röntgenstrukturdaten die in Laufe der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden, wurden in Dezember 1999 zur Überprüfung der ersten Modellierung und zur Erstellung eines Modells, welches nur auf ungespaltenen Serpinen basiert, zwei neue Modellierungen mit der Version 3.5 des Swiss Model Servers durchgeführt.

Hierfür wurden die nachfolgenden Röntgenstrukturdaten verwendet:

¹ Peitsch 1995 a & b, Peitsch 1996

² 3D-Crunch project 1998

³ Bernstein *et al.* 1977

⁴ Stein *et al.* 1991

⁵ Engh *et al.* 1989

⁶ Baumann *et al.* 1991

⁷ Kuhn *et al.* 1990

Protein	Eigenschaften	PDB Eintrag	Proteinkette*
Modellierung 1			
humanes α_1 -Antitrypsin	ungespalten	1QLP ¹	1QLP A
humaner Plasminogen Activator Inhibitor-1	ungespalten	1DB2 ²	1DB2 A
Modellierung 2			
humanes α_1 -Antitrypsin	ungespalten	1QLP ¹	1QLP A
humaner Plasminogen Activator Inhibitor-1	ungespalten	1DB2 ²	1DB2 A
Ovalbumin	ungespalten	1OVA ³	1OVA B
humanes Antithrombin	ungespalten	1ANT ⁴	1ANT I

Tabelle 8: Verwendete Serpin-Strukturdaten aus der Protein Data Bank für die Modellierungen von HCII 1999
 * Version 3.5 von Swiss Model verlangt die Definition der zu verwendenden Proteinkette, da z.T. mehrere Aminosäureketten in einen Strukturfile der PDB enthalten sind. Version 1.1 erforderte dies noch nicht.

Im Ergebnisteil sind jeweils HCII-Modelle dargestellt, bei denen bereits Phenylalanin 195 gegen Cystein ausgetauscht ist. Dies erlaubt es, die Orientierung des neue eingeführten Cysteinrestes zur Helix D zu beurteilen, da eine Orientierung zum Kern des Proteins wahrscheinlich ungünstig für die Ausbildung einer Disulfidbrücke mit dem sauren Aminoterminus von HCII wäre, der nach dem Modell mit der zur Oberfläche zeigenden Seite der Helix D interagiert.

D.2.4 Genetische Methoden

Alle genetischen Arbeiten wurden gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz-GenTG) vom 21.12.1993 durchgeführt und fallen unter die Sicherheitsstufe 1.

Anmerkung: Für alle genetischen Methoden wird unter dH₂O demineralisiertes autoklaviertes (Milli-Q[®]-) Reinstwasser verstanden.

D.2.4.1 Polymerase Kettenreaktion

Die 1983 von Kary B. Mullis erfundene Polymerase-Kettenreaktion⁵ (PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA. Sie ermöglicht es, in kurzer Zeit eine definierte DNA-Sequenz *in vitro* gezielt zu vervielfältigen⁶. Der DNA-Doppelstrang wird im ersten Schritt durch Hitzebehandlung (90 – 95°C) denaturiert. Anschließendes Abkühlen auf 40 – 60°C erlaubt, daß die im großen Überschuß (Faktor $\geq 10^6$ gegenüber der Zielsequenz) eingesetzten synthetischen Oligonucleotid-Primer (Kurzbezeichnung: "Primer") an die komplementären Sequenzen der DNA-Zielsequenz ("Template") hybridisieren. Dieser zweite Vorgang wird als "Annealing" bezeichnet. Einer der Primer ist dabei komplementär zum Plus-Strang der Template-DNA, der zweite Primer ist komplementär zum Minus-Strang, so daß der zu amplifizierende Bereich der DNA durch die Primer flankiert wird. Die für das Annealing verwendete Temperatur ist abhängig von der Sequenz der Primer. Die Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstranges, und damit auch die optimale Anlagerungstemperatur der Primer

¹ Elliott *et al.* 1998

² Nar *et al.* 2000

³ Stein *et al.* 1991

⁴ Carrell *et al.* 1994

⁵ Mullis & Faloona 1987, Mullis 1990

⁶ Saiki *et al.* 1985

an die DNA, läßt sich in erster Näherung aus der Anzahl der G-C- und A-T-Basenpaare und ihrer Abfolge vorhersagen. Die genaueste Methode zur Berechnung der Schmelztemperatur einer DNA-Sequenz ist die "Nearest-Neighbour-Methode"¹, sie ist jedoch sehr aufwendig. In der Praxis wird die Schmelztemperatur T_m von DNA-Hybriden nach folgender vereinfachten Regel berechnet²:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \cdot n(\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \cdot n(\text{G}+\text{C})$$

Hierbei steht " $n(\text{A}+\text{T})$ " für die Anzahl von A- und T-Nucleotiden und " $n(\text{G}+\text{C})$ " für die Anzahl von G- und C-Nucleotiden.

Für die PCR ist anzustreben, zwei Primer mit gleichen oder sehr ähnlichen Schmelztemperaturen zu verwenden³.

Die an die DNA hybridisierten Primer dienen als Startpunkte für die im dritten Schritt meist bei 72 °C stattfindende *in vitro* DNA-Synthese, die beginnend vom 3'-terminalen Ende der Primer jeweils in 5' → 3' Richtung erfolgt. Hierfür werden thermostabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien wie z. B. *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus fulminans* oder *Thermus flavus* verwendet⁴, die z.T. gentechnisch modifiziert wurden (z.B. Unterdrückung der 3'-Exonucleaseaktivität). Bei dieser DNA-Polymerisationen entstehen jeweils zum Template-Strang komplementäre Gegenstränge. Im ersten PCR-Zyklus wird ein DNA-Einzelstrang synthetisiert, dessen 3'-Ende über die zu amplifizierende Sequenz hinaus verlängert wird. Ab dem zweiten Zyklus wird dann die, von den beiden "upstream"- und "downstream"-Primern eingegrenzte Sequenz amplifiziert, wobei mit jedem Zyklus die Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle verdoppelt wird. Entsprechend der exponentiellen Vermehrung der Reaktionsprodukte von 2^n , wobei n die Zahl der PCR-Zyklen angibt, ergibt sich nach 20 PCR-Zyklen eine theoretische Ausbeute von 2^{20} (ca. 10^6) DNA-Molekülen je eingesetztem Ausgangsmolekül. In der Praxis wird allerdings nur eine Ausbeute von ca. 85 % erreicht, da die Ausbeute von Zyklus zu Zyklus variiert und es mit steigender Menge an PCR-Produkt zu einer vermehrten Re-Hybridisierung der PCR-Produkte kommt⁵, dem sog. C_0t -Effekt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die thermostabilen DNA-Polymerasen Klen Therm DNA-Polymerase und cloned *Pfu* DNA-Polymerase verwendet.

Bei der Klen Therm DNA-Polymerase handelt es sich um ein Fragment der *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Ihr fehlt die 5'→3' Exonuclease-Aktivität und sie weist gegenüber der *Taq* DNA-Polymerase eine höhere Thermostabilität und eine um den Faktor zwei geringere Fehlerrate auf⁶.

Die *Pfu* DNA-Polymerase wurde ursprünglich aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert⁷. Sie besitzt neben der 5'→3' Polymerase-Aktivität noch eine 3'→5' Exonuclease-Aktivität. Diese Eigenschaft, die als "proof reading" (Korrekturlesen) bezeichnet wird, senkt die Fehlerhäufigkeit bei der DNA-Synthese gegenüber der *Taq* DNA-Polymerase um den Faktor 12. *Pfu* DNA-Polymerase hat mit einer Fehlerhäufigkeit von $1,3 \times 10^{-6}$ je Basenpaar je Duplikation die niedrigste Fehlerquote aller kommerziell erhältlichen DNA-Polymerasen⁸. Diese Eigenschaft macht *Pfu* DNA-Polymerase besonders attraktiv für Anwendungen, bei denen die DNA des PCR-Produktes bei der späteren Verwendung exprimiert werden soll. Aus diesem Grund wird das Enzym beispielsweise gerne bei der PCR-Mutagenese eingesetzt die als Vorbereitung zur Erzeugung rekombinanter Proteine verwendet wird.

¹ Breslauer *et al.* 1986

² Suggs *et al.* 1981

³ Rychlik 1995

⁴ Gelfand & White 1990

⁵ Mathieu-Daudé *et al.* 1996, Suzuki & Giovannoni 1996

⁶ Barnes 1992, Barnes 1994

⁷ Lundberg *et al.* 1991

⁸ Stratagene Manual 1997, Cline *et al.* 1996

Lösungen:

- Primer :	20 μM in dH_2O
- dNTP Mix :	je 25 mM in dH_2O
- Klen Therm DNA-Polymerase:	10 U/ μl
- cloned <i>Pfu</i> DNA-Polymerase:	2,5 U/ μl
- 10 x Klen Therm Puffer:	siehe D.1.4.2
- 10 x cloned <i>Pfu</i> -Puffer:	siehe D.1.4.2
- DNA-Template	

Sofern nicht anders vermerkt, wurden PCR-Reaktionen nach folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt. In der Negativkontrolle wurde statt DNA-Template dH_2O eingesetzt.

PCR mit Klen Therm DNA-Polymerase			PCR mit cloned <i>Pfu</i> DNA-Polymerase		
Komponente	Volumen in μl	Konzentration in der PCR	Komponente	Volumen in μl	Konzentration in der PCR
upstream Primer	0,5	0,5 μM	upstream Primer	0,5	0,5 μM
downstream Primer	0,5	0,5 μM	downstream Primer	0,5	0,5 μM
10 x Klen T.-Puffer	2,0	1x	10 x <i>Pfu</i> -Puffer	2,0	1x
dNTP Mix	0,16	je 200 μM	dNTP Mix	0,16	je 200 μM
DNA-Polymerase	0,2	2 U/20 μl	DNA-Polymerase	0,2	0,5 U/20 μl
DNA-Template	1,0 - 3,0		DNA-Template	1,0 - 3,0	
dH_2O	13,64 - 15,64		dH_2O	13,64 - 15,64	
Gesamtvolumen	20		Gesamtvolumen	20	

Tabelle 9: Reaktionsansätze für die Polymerase Kettenreaktionen mit Klen Therm DNA-Polymerase bzw. mit cloned *Pfu* DNA-Polymerase

Sofern nicht anders vermerkt wurden folgende Standard-PCR-Programme verwendet:

a) PCR mit Klen Therm DNA-Polymerase

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		94°C	2 Minuten
30 PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Annealing	53°C - 57°C	30 Sekunden
	Elongation	72°C	1 Minute je kB
terminale Elongation		72°C	5 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

b) PCR mit cloned *Pfu* DNA-Polymerase

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		94°C	2 Minuten
30 PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sekunden
	Annealing	57°C oder 59°C	45 Sekunden
	Elongation	72°C	2,5 Minute je kB
terminale Elongation		72°C	5 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

D.2.4.1.1 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob eine Bakterienkolonie ein gewünschtes Plasmid enthält, kann eine PCR mit Plasmid- oder Insert-spezifischen Primern direkt mit der Bakterienkolonie als DNA-Template durchgeführt werden¹. Die PCR wird wie unter D.2.4.1 beschrieben mit Klen Therm DNA-Polymerase durchgeführt. Als Template dient 1 µl Bakterienflüssigkultur (siehe D.2.1.2) oder es wird mittels eines sterilen Zahnstochers eine Bakterienkolonie direkt von einer Agarplatte (siehe D.2.1.2) in den PCR-Ansatz übertragen. Dabei ist darauf zu achten, daß kein Agarmaterial in den Reaktionsansatz gelangt.

In eigenen Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Primer so gewählt werden sollten, daß das entstehende PCR-Produkt kleiner als 1000 Bp ist, da es sonst oft zu falsch negativen Ergebnissen kommt (Ergebnisse nicht dargestellt).

D.2.4.2 PCR-Mutagenese

Bei der PCR handelt es sich um eine repetitive Neusynthese und exponentielle Amplifikation von DNA. Diese Tatsache prädestiniert die PCR als methodisches Werkzeug zur gezielten *in vitro* Einführung von Mutationen in DNA-Stränge. Hierzu sind zahlreiche Varianten entwickelt worden, die zur Erzeugung von Deletionen, Insertionen und Substitutionen von DNA-Sequenzen oder der Herstellung von chimärer DNA dienen². Exemplarisch für die Vielzahl der PCR-Mutagenese-Methoden sind in den Fußnoten einige frühe Veröffentlichung zu diesem Thema zitiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt einzelne Nucleotide der cDNA von HCII mutiert, mit dem Ziel die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern und Restriktions-endonuclease-Erkennungsstellen mittels stiller Mutationen zu entfernen.

Die Mutagenese erfolgte dabei über mutagene Primer, die gegenüber der Ausgangs-DNA in einigen Positionen Veränderungen aufweisen. Die Primer sind trotz dieser sog. "mismatches" in der Lage, an die Template-DNA zu hybridisieren. Die daraus entstehenden PCR-Produkte weisen somit gegenüber der Ausgangssequenz eine veränderte Nucleotidsequenz auf.

¹ Hoffman & Brain 1991, Dallas-Yang *et al.* 1998

² Mullis & Faloona 1987, Higuchi *et al.* 1988, Kadowaki *et al.* 1989, Vallette *et al.* 1989, Ho *et al.* 1989

Neben den Mutationen, die für eine veränderte Proteinsequenz kodieren, wurden in die mutagenen Primer sogenannte Indikatormutationen eingeführt. Hierbei handelt es sich um stille Mutationen, die Restriktionsendonuclease-Erkennungsstellen entfernen. Diese Technik ermöglicht es, den Erfolg der Mutagenese indirekt über das veränderte Restriktionsschnittmuster zu erkennen, da die gewünschte Mutation und die Indikatormutation über denselben Primer eingefügt wurden.

Aufgrund der 3'→5' Exonucleaseaktivität der *Pfu* DNA-Polymerase¹ müssen die mutagenen Primer so konstruiert werden, daß sich stromaufwärts der "mismatches" mindestens 10 korrekt passende Basen befinden, da sonst aufgrund der "proof-reading-Aktivität" der Polymerase die beabsichtigten Mutationen zur Originalsequenz zurückkorrigiert werden können. Ebenso wird empfohlen, daß sich auf der 3'-Seite der "Mismatches" 10 korrekt passende Basen befinden².

Die Primer für die PCR-Mutagenesen wurden so gelegt, daß sich innerhalb der entstehenden PCR-Mutagenese-Produkte Restriktionsschnittstellen befinden, über die das PCR-Mutagenese-Produkt einfach gegen die entsprechende Originalsequenz in der cDNA ausgetauscht werden kann.

D.2.4.2.1 PCR-Mutagenese nach Picard *et al.*²

Die beschriebene PCR-Mutagenesemethode nutzt die Tatsache, daß auch doppelsträngige DNA-Segmente wie z.B. PCR-Produkte als Primer fungieren können³. Die Methode ermöglicht es mittels eines mutagenen Primers, eines "upstream"- und eines "downstream"-Primers ein PCR-Mutagenese-Produkt zu erhalten, bei dem die Lage der äußeren Primer frei gewählt werden kann, was für nachfolgende Arbeiten, beispielsweise den Austausch von DNA-Segmenten durch Restriktionsspaltung von großem Vorteil ist.

Die PCR- Mutagenese gliedert sich in drei Teile (siehe Abbildung 13):

Im ersten Schritt wird mit dem mutagenen Primer und dem "upstream"-Primer ein kurzes PCR-Produkt erzeugt, welches bereits die gewünschte Mutation enthält. Dieses PCR-Produkt, dessen Größe 400 Bp nicht überschreiten sollte, fungiert im nächsten Schritt als Megaprimer. Die Primer der ersten Runde werden nur in einer Konzentration von 100 pmol/l eingesetzt, um die Bildung ungewollter PCR-Produkte in der 2. PCR-Runde zu minimieren. In den nachfolgenden beiden Schritten ist die Konzentration der zugegebenen Primer in der PCR jeweils 0,5 µmol/l.

Im zweiten Schritt wird der "downstream"-Primer zugegeben. Er bildet mit dem in der ersten Runde gebildeten Megaprimer das gewünschte PCR-Mutagenese-Produkt.

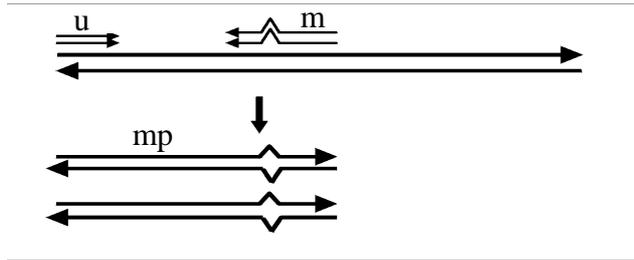
Im dritten Schritt wird noch einmal "upstream"-Primer zugegeben, um die Ausbeute der PCR-Mutagenese zu steigern.

Der Vorteil der beschriebenen Methode liegt in der einfachen Durchführung ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte. Ihr Nachteil ist, daß durch die im PCR-Ansatz vorhandenen beiden äußeren Primer und die Template-DNA auch nicht mutiertes PCR-Produkt entsteht.

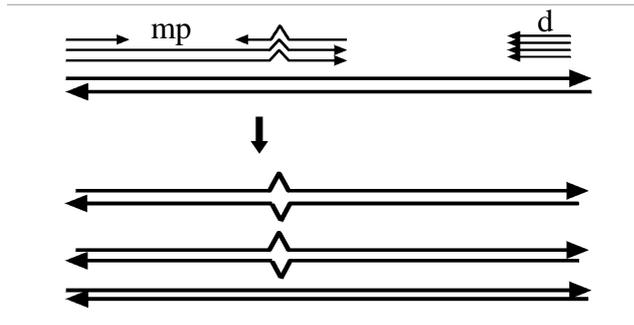
¹ Lundberg *et al.* 1991

² Picard *et al.* 1994

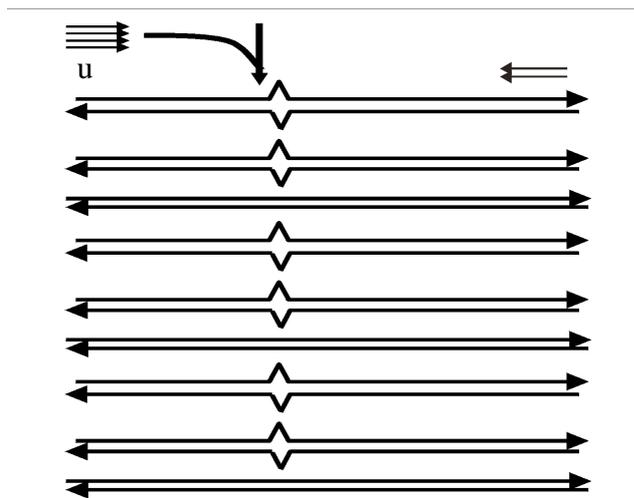
³ Sarkar & Sommer 1992

Schritt 1:

Erzeugung des Megaprimers durch "upstream"- und mutagenen Primer

Schritt 2:

Erzeugung des PCR-Mutagenese-Produktes durch Zugabe des "downstream"-Primers

Schritt 3:

Steigerung der Ausbeute durch erneute Zugabe des "upstream"-Primers

Legende:

u: "upstream"-Primer
d: "downstream"-Primer
m: mutagener-Primer
mp: Megaprimer

Abbildung 13 : Prinzip der PCR-Mutagenese nach Picard *et al.*

Lösungen:

- "upstream"-Primer : 5 μ M und 20 μ M in dH₂O
- mutagener Primer : 5 μ M in dH₂O
- "downstream"-Primer: 20 μ M in dH₂O
- dNTP Mix : je 25 mM in dH₂O
- cloned *Pfu* DNA-Polymerase: 2,5 U/ μ l
- 10 x cloned *Pfu*-Puffer: siehe D.1.4.2
- DNA-Template

PCR-Programm:

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		94°C	2 Minuten
10 PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sekunden
	Annealing	55°C oder 57°C	45 Sekunden
	Elongation	72°C	2,5 Minuten je kB
terminale Elongation		72°C	5 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

Für den ersten Schritt der PCR-Mutagenese wird nachfolgender Reaktionsansatz hergestellt und das oben angegebene PCR-Programm durchgeführt.

Als Negativkontrolle wird statt DNA-Template dH₂O eingesetzt.

Komponente	Volumen in µl	Konzentration in der PCR
"upstream"-Primer (5µM)	0,4	0,1 µM
mutagener Primer (5µM)	0,4	0,1 µM
10 x cloned <i>Pfu</i> -Puffer	2,0	1x
dNTP Mix	0,16	je 200 µM
DNA-Polymerase	0,2	0,5 U/20 µl
DNA-Template	1,0	
dH ₂ O	15,84	
Gesamtvolumen	20	

Für den zweiten Teilschritt werden zum Reaktionsansatz 0,5 µl der "downstream"-Primer-Lösung zugegeben und das PCR-Programm wie beschrieben durchgeführt.

Zur Steigerung der Ausbeute wird im dritten Schritt 0,5 µl 20 µM "upstream"-Primer-Lösung zugegeben und das beschriebene PCR-Programm ein drittes Mal durchlaufen.

D.2.4.2.2 PCR-Mutagenese durch Overlap-Extension-PCR

Das wesentliche Element der Mutagenese durch Overlap-Extension-PCR¹ ist die Verwendung komplementärer mutagener Primer, deren PCR-Produkte in der Lage sind, aneinander zu hybridisieren.

Im ersten Schritt entstehen in getrennten Reaktionen zwei PCR-Produkte, die bereits die gewünschten Mutationen tragen, und an ihren Enden zueinander komplementär sind (siehe Abbildung 14). Anschließend werden diese PCR-Produkte aufgereinigt.

¹ Ho *et al.* 1989

Im dritten Schritt werden etwa gleich große Mengen der gereinigten PCR-Produkte in einen gemeinsamen Reaktionsansatz mit *Pfu* DNA-Polymerase und dNTPs gegeben. In fünf Hybridisierungs- und Elongationszyklen können die komplementären Bereiche der beiden PCR-Produkte aneinander hybridisieren und werden durch die DNA-Polymerase zum vollständigen doppelsträngigen Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkt ergänzt.

Im letzten Schritt werden die beiden äußeren nicht-mutagenen Primer zugegeben und zur Steigerung der Ausbeute eine herkömmliche PCR durchgeführt.

Der Vorteil der beschriebenen Methode liegt darin, daß als PCR-Mutagenese-Produkt nur mutierte DNA entstehen kann. Durch die Verwendung von mehreren PCR-Produkten mit komplementären Enden können zudem gleichzeitig mehrere Mutationen eingeführt werden¹.

Der Nachteil der Methode liegt in dem zusätzlichen Arbeitsschritt der Aufreinigung der PCR-Produkte. Zudem hatte sich in Vorversuchen gezeigt, daß die Menge an eingesetzten aufgereinigten PCR-Produkten der ersten Runde einen wesentlichen Einfluß auf die Ausbeute der Overlap-Extension-PCR hat, weshalb zusätzlich jede Mutagenese erst optimiert werden muß. (Ergebnisse nicht dargestellt)

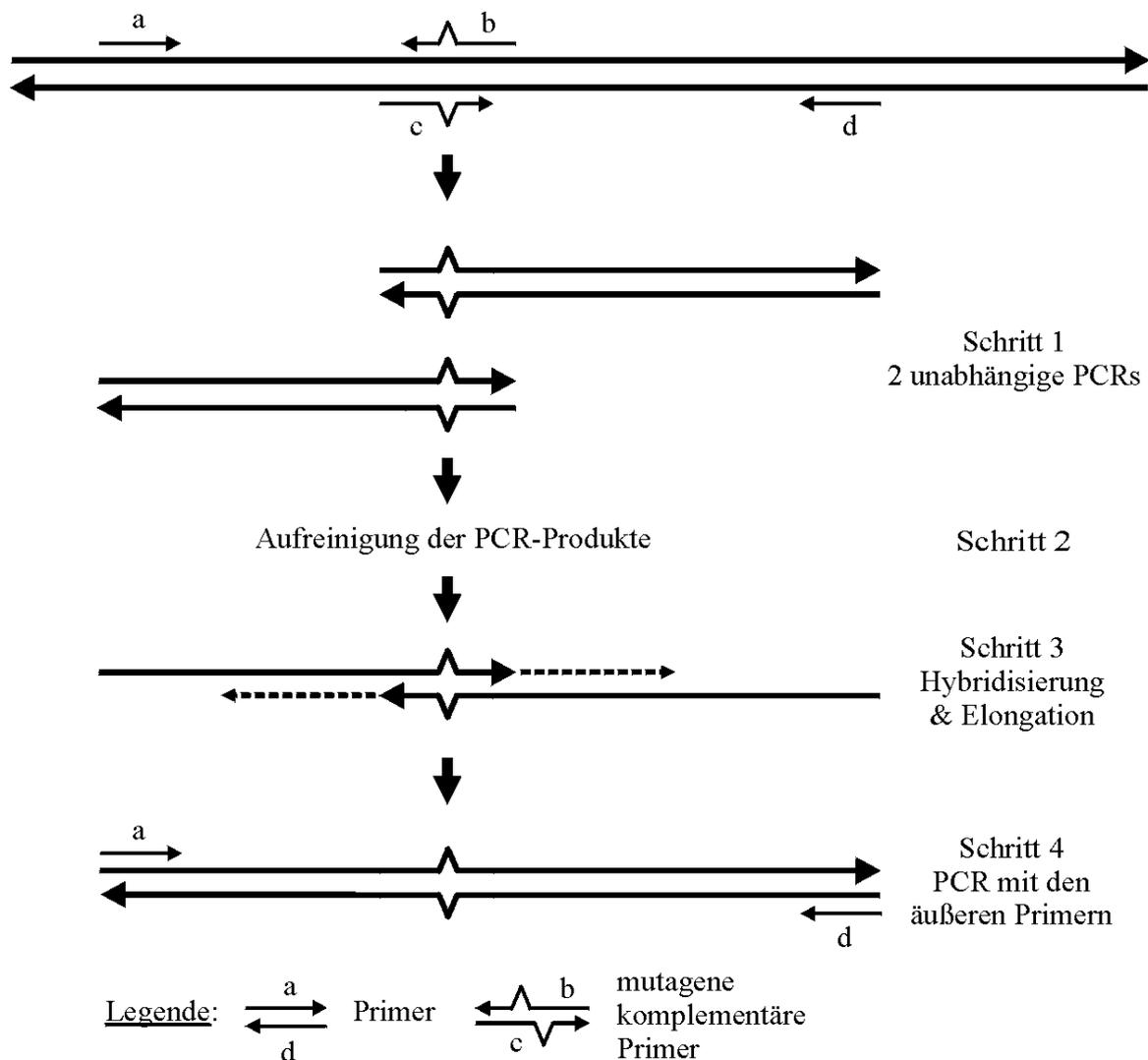


Abbildung 14 : Prinzip der Overlap-Extension-PCR-Mutagenese

¹ Ge & Rudolph 1997

Lösungen:

- Primer: 20 μ M in dH₂O
- dNTP Mix : je 25 mM in dH₂O
- cloned *Pfu* DNA-Polymerase: 2,5 U/ μ l
- 10 x cloned *Pfu*-Puffer: siehe D.1.4.2
- DNA-Template

Hybridisierungs- und Elongations-Programm:

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		94°C	2 Minuten
5 Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sekunden
	Hybridisierung	50°C	60 Sekunden
	Elongation	72°C	2 Minuten
terminale Elongation		72°C	5 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

PCR-Programm:

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		94°C	2 Minuten
20 PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sekunden
	Annealing	55°C	45 Sekunden
	Elongation	72°C	2,5 Minuten je kB
terminale Elongation		72°C	5 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

Im ersten Schritt der Overlap-Extension-PCR-Mutagenese werden zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit *Pfu* DNA-Polymerase und den Primerkombinationen a + b bzw. c + d (siehe Abbildung 14) -wie unter Abschnitt D.2.4.1 beschrieben- durchgeführt.

Die entstehenden PCR-Produkte werden im 2. Schritt mittels einer Gelelektrophorese (siehe D.2.4.3) in einem 2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt, die PCR-Produktbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des JetSorb Gel Extraction Kit (siehe D.2.4.4.1) extrahiert. Bei diesem Schritt werden die PCR-Produkte von den Primern getrennt.

Aliquots der extrahierten PCR-Produkte werden zur Kontrolle der Ausbeute einer erneuten Agarosegelelektrophorese unterworfen.

Für den dritten Schritt, die Hybridisierung und Elongation wird folgender Reaktionsansatz mit etwas gleich großen Mengen der beiden PCR-Produkte (die Abschätzung erfolgt über die Agarosegelelektrophorese der aufgereinigten PCR-Produkte) hergestellt und das Hybridisierungs- und Elongations-Programm durchgeführt.

Komponente	Volumen in μl	Konzentration in der PCR
PCR-Produkt 1	0,5 - 2,0	
PCR-Produkt 2	0,5 - 2,0	
10 x cloned <i>Pfu</i> -Puffer	2,0	1x
dNTP Mix	0,16	je 200 μM
DNA-Polymerase	0,2	0,5U/20 μl
dH ₂ O	13,64 - 16,64	
Gesamtvolumen	20	

Für den letzten Schritt werden je 0,5 μl der beiden äußeren Primer a und d (siehe Abbildung 14) zugegeben und das angegebene PCR-Programm durchgeführt.

Als Negativkontrolle wird statt DNA-Template dH₂O eingesetzt. Als Kontrolle, welche ein PCR-Produkt der gewünschten Länge, aber ohne Mutation bildet, wird ein PCR-Ansatz mit den beiden äußeren Primern a und d -wie unter Abschnitt D.2.4.1 beschrieben- durchgeführt.

D.2.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Bei der Agarosegelelektrophorese¹ wandert DNA aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen zur Anode. Die DNA bewegt sich je nach Größe und Konformation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Gelmatrix.

Agarose ist ein lineares Kohlehydrat aus roten Meeresalgen, das im wesentlichen aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose besteht.

Für lineare DNA besteht dabei über einen weiten Größenbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus der Länge des Fragments (in Bp) und der relativen Wanderungsdistanz im Agarosegel².

Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente hängt zusätzlich von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers, sowie der Anwesenheit interkalierender Farbstoffe ab. Für die Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente werden Agarosegele mit höherer Agarosekonzentration verwendet als für die Auftrennung größerer DNA-Fragmente³.

Durch den Vergleich mit einer bekannten Menge an aufgetragenem DNA-Längenstandard können Größe und Konzentration der eingesetzten DNA abgeschätzt werden. Dafür wird die DNA meist mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) angefärbt, welches in der Lage ist in die DNA zu interkalieren. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht angeregt werden und emittiert orange-rotes Licht der Wellenlänge 590 nm.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten zirkulärer DNA superhelikaler oder offener Struktur hängen in erster Linie von der Konzentration des Agarosegels ab. In der Regel wandert die superhelikale Form der DNA schneller im Gel als die lineare. Offen zirkuläre DNA wandert im Agarosegel wesentlich langsamer als superspiralisierte oder lineare DNA.

¹ Southern 1979

² McDonnell *et al.* 1977, Kozulic 1995

³ Sambrook *et al.* 1989

Lösungen:

- 1 x TAE-Puffer pH 8,0:	40 mM Tris-HCl 10 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
- 10 x Auftragspuffer pH 7,5:	50 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol 0,1 M EDTA
- Ethidiumbromid-Färbelösung:	40 µg/l in dH ₂ O

Je nach Größe der zu untersuchenden DNA werden 0,7 – 3 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Lösung klar wird und anschließend in eine Gelelektrophoresekammer mit einem Probenkamm gegossen. Das Gel härtet innerhalb einer halben Stunde aus und wird dann mit 1 x TAE-Puffer überschichtet.

Die DNA-haltige Lösung (maximal 20 µl) wird mit 1/10 Volumen 10 x Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung und ggf. zur Konzentrationsbestimmung wird eine definierte Menge DNA-Längenstandard (siehe D.1.5) in eine Geltasche gegeben.

Die Elektrophorese läuft für ca. ½ Stunde bei einer Feldstärke von 20 V/cm. Anschließend wird das Gel für 10 Minuten in das Ethidiumbromid-Färbebad gelegt und danach für 10 Minuten zur Entfernung von nicht-interkaliertem Ethidiumbromid aus der Gelmatrix in dH₂O gewässert.

Die Auswertung und Dokumentation erfolgt bei einer Wellenlänge von 312 nm auf dem Transilluminator mit Hilfe einer CCD-Videokamera und der Photo Finish Zsoft Software (siehe D.1.13). Mit Hilfe der WinCam Software (siehe D.1.13) kann die DNA-Konzentration densitometrisch bestimmt werden (siehe D.2.4.5.2), ebenso die Größe von linearen DNA-Fragmenten.

D.2.4.4 Reinigung von DNA

D.2.4.4.1 Isolation von DNA aus Agarosegelen mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit

Die Isolation von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit der Firma Genomed.

Das DNA-haltige Agarosegelfragment wird dabei bei 50°C im mitgelieferten Puffer verflüssigt und die DNA an Kieselgel gebunden. Nach zwei Waschschritten erfolgt die Elution mit 20 µl 5 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5.

Die Reinigung erfolgt entsprechend den Anweisungen des Herstellers¹.

¹ Genomed Manual 1994

D.2.4.4.2 Isolation von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Bei der Isolation von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen wird das DNA-haltige Agarosegelfragment bei 50°C in den mitgelieferten Puffern verflüssigt und anschließend an eine Siliziumdioxid-Membran gebunden, welche sich in einem Zentrifugensäulchen befindet. Die Elution erfolgt nach zwei Waschschritten mit dem mitgelieferten Tris-EDTA-Puffer.

Die Reinigung erfolgt entsprechend den Anweisungen des Herstellers¹.

D.2.4.4.3 Isolation von Plasmid-DNA mittels Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit

Für die Isolation von Plasmiden aus Bakterienflüssigkulturen bis zu 3 ml wurde das Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit der Firma Bio-Rad verwendet.

Die Bakterien von bis zu 3 ml Flüssigkultur (siehe D.2.1.2) werden hierbei durch alkalische Lyse lysiert, die DNA an Kieselgel gebunden, Zelltrümmer abzentrifugiert und die DNA nach zwei Waschschritten mit 70 µl 5 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 von der Siliziumdioxid-Matrix eluiert.

Die Isolation erfolgt entsprechend den Anweisungen des Herstellers².

D.2.4.4.4 Plasmid Maxi-Prep

Die Methode dient zur Isolation von Plasmiden aus bis zu 50 ml Bakterien-Flüssigkultur. Grundlage der Methode ist das Protokoll von Zhou *et al.*³, welches um einen zusätzlichen Phenol-Chloroform-Reinigungsschritt erweitert wurde.

Die Plasmidisolierung gliedert sich in fünf Abschnitte:

Der erste Schritt ist eine alkalische Lyse der Bakterien⁴ in EDTA-haltigem Puffer mit NaOH und SDS⁵. SDS löst dabei als Detergenz die Phospholide und Proteinkomplexe der Zellwand, NaOH denaturiert chromosomale DNA sowie Proteine. Das Lysat wird anschließend mit saurer Kaliumacetat-Lösung neutralisiert. Dabei entstehendes Kaliumdodecylsulfat ist wesentlich schlechter in Wasser löslich als Natriumdodecylsulfat und fällt unter den herrschenden hohen Salzkonzentrationen aus. Denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Debris bilden in Anwesenheit von Kaliumdodecylsulfat unlösliche Komplexe, werden mit dem Salz präzipitiert und können abzentrifugiert werden. Die kleinen Plasmidmoleküle bleiben dabei in Lösung.

Zur Entfernung verbleibender Proteinverunreinigungen wird im zweiten Schritt eine Phenol-Chloroform-Behandlung durchgeführt⁶. Proteine werden dabei denaturiert und bleiben bei der Phasentrennung durch Zentrifugation in der Interphase zwischen organischer Phase und wässriger Phase.

Die letzten drei Schritte umfassen eine Isopropanol-Fällung, eine RNase A-Behandlung zur Entfernung von RNA und eine Polyethylenglykol-Fällung.

¹ Qiagen Manual 1999

² Bio-Rad Manual

³ Zhou *et al.* 1997

⁴ Birnboim & Doly 1979

⁵ Feliciello & Chinali 1993

⁶ Sambrook *et al.* 1989

Lösungen:

- GTE-Puffer pH 8,0: 25 mM Tris-HCl
50 mM Glukose
10 mM EDTA
- Lyse-Lösung: 0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS
- Neutralisations-Lösung: 80 ml 5 M Kaliumacetat-Lösung
11,5 ml Eisessig
8,5 ml dH₂O
- TE-Puffer pH 8,0: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
- PEG-MgCl₂-Lösung: 30 mM MgCl₂
40 % (w/v) PEG 8000
- RNase A Lösung: 20 µg/ml RNase A
in TE-Puffer
Zur Inaktivierung von DNase-Aktivität wird die Lösung 10 Minuten auf 94°C erhitzt.
- Roti-Phenol
- Chloroform
- Isopropanol
- 70 % (v/v) Ethanol

GTE-Puffer, TE-Puffer und PEG-MgCl₂-Lösung werden für 30 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Lyse-Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

Der Ablauf der Plasmidisolierung ist nachfolgend stichpunktartig dargestellt:

- 1) Bis zu 50 ml Bakterienkultur, die in LB-Flüssigmedium kultiviert wurden (siehe D.2.1.2) 5 min bei 5000 x g abzentrifugieren, den Überstand vollständig entfernen und die Zellen in 1,2 ml eiskaltem GTE-Puffer resuspendieren.
- 2) 2,4 ml Lyse-Lösung zugeben und mehrmals invertieren, bis die Lösung klar wird.
- 3) 3,6 ml eiskalte Neutralisations-Lösung zugeben und durch Invertieren gründlich mischen.
- 4) Lösung 10 Minuten bei >15000 x g und RT zentrifugieren und den klaren Überstand anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen.
- 5) 2 ml Roti-Phenol zugeben und gut mischen, anschließend 1,5 ml Chloroform zugeben und erneut gut mischen.
- 6) Zur Trennung der Phasen wird 10 Minuten bei >15000 x g und RT zentrifugiert und anschließend die obere wäßrige Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen. Es ist wichtig, daß dabei keine Interphase mit überführt wird.

- 7) Zur Abtrennung des restlichen Phenols erneut 1,5 ml Chloroform zugeben, erneut gut mischen und 10 min bei $>15\,000 \times g$ und RT zentrifugieren. Die obere wäßrige Phase wird anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.
- 8) 50 % (v/v) Isopropanol zugeben, durch Invertieren mischen und 15 min bei $>15000 \times g$ bei RT zentrifugieren. Die Nucleinsäuren werden bei diesem Schritt als weißes Pellet abgetrennt.
- 9) Überstand vollständig entfernen, Pellet in 1 ml RNase A Lösung resuspendieren und zum Abbau der RNA 60 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
- 11) 500 μl PEG-MgCl₂-Lösung zugeben, gründlich mischen, Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführen, und 30 min bei $>15000 \times g$ und RT zentrifugieren
- 12) Überstand vollständig abziehen, vorsichtig 1,5 ml 0°C kaltes 70 %-iges Ethanol zugeben und 10 min bei $>15\,000 \times g$ zentrifugieren.
- 13) Ethanol vollständig abziehen, DNA lufttrocknen und in 100 μl TE Puffer resuspendieren. (ggf. 10 Minuten Inkubation bei 56°C)

D.2.4.4.5 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wird der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat (pH 5,2) zugesetzt und anschließend 2 Volumen (bezogen auf das Volumen nach Kaliumacetat-Zugabe) 96 %-iges Ethanol. Die Lösung wird gemischt, 1 - 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend bei $\geq 13000 \times g$ für 15 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird restlos entfernt, das DNA-Pellet mit 1 ml 0°C kaltem 70%-igem Ethanol vorsichtig überschichtet ohne das Pellet abzulösen und für 5 Minuten bei $\geq 13000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird erneut restlos entfernt, die DNA luftgetrocknet und in geeignetem Lösungsmittel resuspendiert.

D.2.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

D.2.4.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA basiert auf ihrer UV-Absorption mit einem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe verantwortlich. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten, da Quarzküvetten kein UV-Licht absorbieren. Nicht basengepaarte Nucleinsäuren besitzen eine höhere Absorption als basengepaarte Nucleinsäuren, ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird, weshalb für RNA und einzelsträngige DNA andere Extinktionskoeffizienten gelten, als für doppelsträngige DNA.

In der Praxis verwendet man nachfolgende Näherungswerte für die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren¹. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 1 OD_{260nm} einer Konzentration von :

- 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
- 40 µg/ml einzelsträngiger DNA
- 33 µg/ml einzelsträngiger RNA
- 20-30 µg/ml Oligonucleotiden

Die Reinheit einer Nucleinsäurelösung läßt sich anhand des Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm abschätzen, da Proteine ein Absorptionsmaximum von 280 nm besitzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt ein OD_{260nm}/OD_{280nm}-Verhältnis von 1,8, eine reine RNA-Lösung von 2,0.

D.2.4.5.2 Densitometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration eine DNA-Lösung kann durch den Vergleich mit einer DNA-Lösung bekannter Konzentration ermittelt werden. Dazu wird mit verschiedenen Verdünnungsstufen der zu untersuchenden DNA-Probe zusammen mit einer bekannten Menge DNA, beispielsweise einem DNA-Längenstandard, eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe D.2.4.3). Nach der Ethidiumbromidfärbung wird das Gel mittels einer CCD-Videokamera digital dokumentiert und anschließend die Konzentration der zu untersuchenden DNA-Lösung mit Hilfe der WinCam V.2.2. Software (siehe D.1.13) bestimmt.

D.2.4.6 Restriktionsspaltung von DNA²

Restriktionsendonucleasen vom Typ II erkennen definierte, meist palindrome DNA-Erkennungssequenzen von meist vier bis acht Basenpaaren und spalten den DNA-Doppelstrang innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz. Dabei werden die Phosphodiester-Bindungen beider DNA-Stränge hydrolysiert, so daß das 5'-Ende der entstehenden Fragmente an der Desoxyribose eine 5'-Phosphatgruppe trägt, das andere Ende eine 3'-Hydroxylgruppe. Die Schnitte können dabei versetzt sein, so daß überstehende Enden, sog. "sticky ends" entstehen, oder die Schnitte können an identischen Positionen in der komplementären Sequenz erfolgen, was zur Ausbildung glatter Enden, sog. "blunt ends" führt. Die Spaltung von DNA kann allerdings in manchen Fällen verhindert werden, wenn die Erkennungssequenz durch Basenmethylierung modifiziert ist³.

Die Nomenklatur der Typ II Restriktionsendonucleasen basiert auf ihrem jeweiligen Herkunftsorganismus. So steht ***EcoRI*** beispielsweise für das erste (**I**) aus dem Bakterium ***Escherichia Coli*** Stamm **RY 13** isolierte Restriktionsenzym.

Die Inkubation mit Restriktionsenzymen erfolgt in (meist von Hersteller mitgelieferten) Puffern, deren Salzkonzentration und pH-Wert eine möglichst hohe spezifische Aktivität der Enzyme gewährleistet. Einige Enzyme weisen jedoch, besonders bei suboptimalen Pufferbedingungen eine unspezifische Spaltaktivität auf, die sog "star"-Aktivität.

Die Aktivität der Restriktionsendonucleasen wird in Units (U) angegeben, dabei ist eine Unit die Menge an Restriktionsenzym, welche 1 µg Ziel-DNA in einem Reaktionsansatz von 50 µl innerhalb einer Stunde unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen vollständig spaltet⁴.

¹ Sambrook et al. 1989

² Smith & Birnstiel 1976

³ May & Hattmann 1975, Geier & Modrich 1979

⁴ New England Biolabs 2000/2001

Für eine Restriktionsspaltung von DNA in einem Volumen von 20 μl wird folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Komponente	Volumen	Konzentration im Ansatz
DNA + dH ₂ O	x μl	
10 x Reaktionspuffer	2,0 μl	1 x
ggf. 100 x BSA-Lösung	0,2 μl	1 x
Restriktionsenzym(e)		je 10 U/20 μl
Gesamtvolumen	20 μl	

Das Volumen der Glycerin-haltigen Enzymlösungen sollte 10 % (v/v) nicht überschreiten. Die verwendeten Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer sind in Abschnitt D.1.4.1 aufgeführt. Die Inkubation, sofern nicht anders vermerkt, erfolgt, mit Ausnahme von Restriktionsspaltungen mit *Sma*I (25°C), bei 37°C für 45 bis 300 Minuten. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgt durch 10-minütige Inkubation bei 65°C oder durch Zugabe von 10 x Auftragspuffer (siehe D.2.4.3).

Die spezifischen Reaktionsbedingungen (Enzyme, Puffer und Inkubationsdauer), sowie Abweichungen von den beschriebenen Bedingungen sind ggf. in den jeweiligen Abschnitten, in denen Restriktionsspaltungen durchgeführt wurden, angegeben.

D.2.4.7 Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase (SAP) aus der arktischen Garnele (*P. borealis*) katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphatrestes von DNA und RNA. Sie läßt sich im Gegensatz zu alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm durch 10-minütige Behandlung bei 65°C inaktivieren. Für die Dephosphorylierung von DNA wird dem Restriktionsansatz (siehe D.2.4.6) nach der Hitzeinaktivierung 1/10 Volumen des mitgelieferten 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers (siehe D.1.4.2) sowie 1 Unit SAP je 50 ng DNA zugesetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym 10 Minuten lang bei 65 °C hitzeinaktiviert.

D.2.4.8 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA stehen prinzipiell zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Die heute kaum noch verwendete DNA-Sequenzierung nach Maxam & Gilbert¹ welche auf einer basenspezifischen chemischen Spaltung von DNA beruht und die enzymatische Sequenzierung nach Sanger². Dieses auch als Kettenabbruchmethode oder Didesoxy-Methode bezeichnete Verfahren nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen einen Oligonucleotidprimer zu verlängern, welcher an ein DNA-Template hybridisiert ist. In vier getrennten basenspezifischen Reaktionsansätzen befinden sich dabei DNA-Template, ein Primer, DNA-Polymerase, alle vier dNTPs und je eines der vier 2'-3'-Didesoxynucleosid-5'-Triphosphate ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP. Diese sogenannten Didesoxyanalogue unterscheiden sich von normalen Nucleotiden dadurch, daß sich an der Ribose keine 3'-Hydroxylgruppe befindet, welche bei der Verlängerung eines DNA-Stranges einen nucleophilen Angriff auf das α -Phosphoratom eines dNTPs führt. Der Einbau eines Didesoxyanalogs in einen sich verlängernden DNA-Strang führt damit zum Abbruch der DNA-Synthese. Wegen dieser Eigenschaft der ddNTPs kommt es bei der Verlängerung des DNA-Stranges selektiv bei "G", "A", "T" oder "C", je nachdem, welches ddNTP zugesetzt wurde, statistisch an jeder Position des DNA-Stranges zu einem Kettenabbruch und damit zu jeweils unterschiedlich langen neu synthetisierten DNA-Ketten.

Eine Weiterentwicklung der Sanger-Methode stellt das Cycle-Sequencing dar³. Hierbei wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet und eine Polymerase-Kettenreaktion, allerdings nur mit einem Primer durchgeführt. Hierdurch kommt es zu einer linearen Amplifikation der eingesetzten DNA, wodurch deutlich weniger Template-DNA eingesetzt werden muß.

Die Sequenzanalyse erfolgt elektrophoretisch mittels eines denaturierenden Polyacrylamidgels nachdem die entstandenen DNA-Fragmente bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt wurden, um intra- bzw. intermolekulare Basenpaarungen von DNA-Strängen zu verhindern. Voraussetzung für die Detektion ist, daß die neusynthetisierte DNA eine Markierung besitzt, über welche sie nachgewiesen werden kann. Hierfür gibt es zahlreiche Methoden, wie beispielsweise die radioaktive Markierung, die Markierung mit Biotin oder Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die vier Reaktionsprodukte werden nebeneinander aufgetragen und erzeugen bei der Elektrophorese eine "Leiter" von Banden, wobei sich jede "Stufe" hinsichtlich ihrer Größe um eine Base von der nächsten Stufe unterscheidet. Durch diese Aufeinanderfolge unterschiedlich langer Fragmente in den vier Spuren G, A, T und C kann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

¹ Maxam & Gilbert 1977

² Sanger *et al.* 1977

³ Murray 1989

D.2.4.8.1 DNA-Sequenzierung mit dem DNA-Sequencer 1500

Bei dem verwendeten Sequenziersystem handelt es sich um ein Direct-Blotting System, bei dem die DNA-Fragmente bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese das Sequenziergel vollständig durchlaufen und am Ende des Gels aus diesem wieder austreten. Sie werden dabei direkt auf eine Nylon-Membran geblottet, welche direkt unter den Enden der Glasplatten des Elektrophoresesystems entlanggeführt wird, so daß sich durch die Bewegung der Membran die kurzen DNA-Fragmente vorne auf der Membran befinden, die langen Fragmente am Ende. Zur Detektion werden Biotin-markierte ddNTPs verwendet, welche über ein Biotin-bindendes Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen werden.

Für die kolorimetrische Detektion der Fragmente auf der Membran dient das NBT/BCIP Färbesystem. Die Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase bindet dabei an die Biotin-markierten ddNTPs und spaltet die Phosphatgruppe vom BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat) ab. Nach der Oxidation fällt am Entstehungsort ein blauer Indigofarbstoff aus. Die Farbreaktion wird durch NTP (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) noch zusätzlich verstärkt.

Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 15 dargestellt.

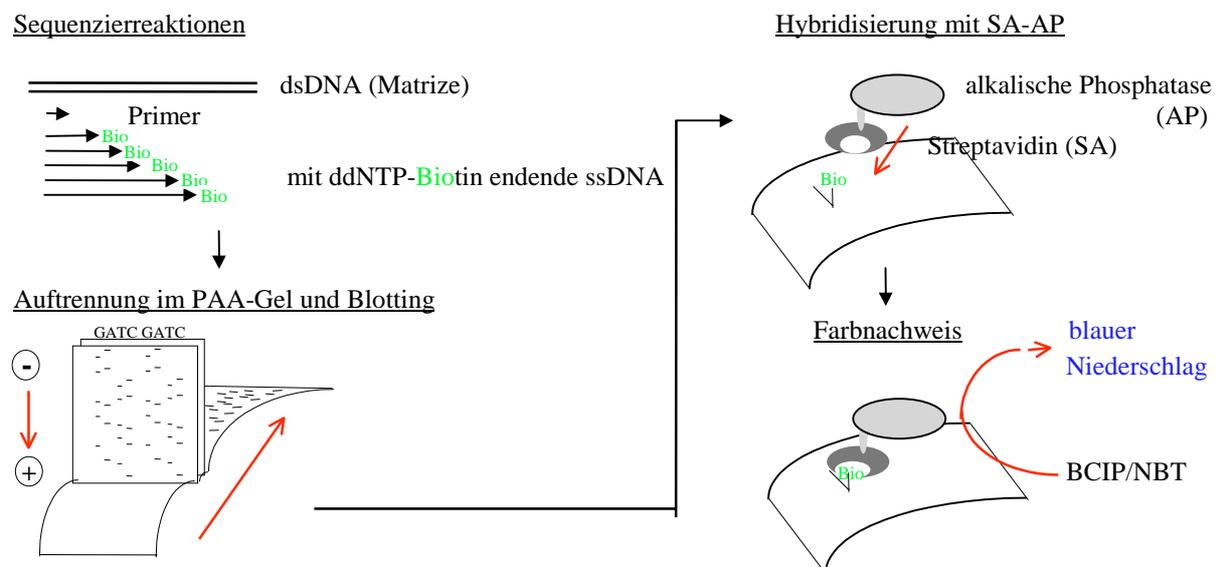


Abbildung 15: Prinzip der DNA-Sequenzierung mit dem DNA-Sequencer 1500

Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Paul-Bertram Kamp zu Verfügung gestellt.

Mit dem GATC Sequencer 1500 System wurden, bis zum Erwerb des Li-Cor DNA 4000 Sequenziersystems, die in die Vektoren neu eingesetzten Inserts sequenziert.

Tabelle 10 listet die teilweise sequenzierten Plasmide und die dafür verwendeten Primer auf.

Plasmid	Sequenzierprimer (siehe D.1.8)
pWTBiI	Dag 21
pSBR3	HC2/Glu429/+
pSBR4	HC2/Glu228/, HC2/Ser273/2/+, HC2/Lys 391/-
pHCII F195C	HC2/Leu110/+
pHCII C273S/C323S	HC2/Glu228/+, HC2/Lys391/-

Tabelle 10: Kombination der teilweise sequenzierten Plasmide und der dafür verwendeten Sequenzierprimer

D.2.4.8.1.1 Sequenzierreaktionen

Für die Sequenzierreaktionen wurde das Biocycle Sequencing Kit der Firma GATC verwendet. Es verwendet anstelle von dGTP dITP (Desoxy-Inosintriophosphat), wodurch es zu einem verstärkten Signal und zu verringerter Sekundärstrukturbildung kommt¹. Sequenator ist ein Enzym-Puffer-Gemisch, das zu verbesserten Sequenzierergebnissen führt (keine näheren Angaben des Herstellers).

Lösungen:

- Plasmid-Lösung
- Primer (20 µM) in dH₂O
- 10 x Klen Them Puffer (siehe D.1.4.2)
- dITP-Mix (aus Biocycle Sequencing Kit) (enthält dITP, dATP, dTTP, dCTP)
- Sequenator
- Klen Thermase Sequenase (10 U/µl)
- ddNTP-Lösungen (aus Biocycle Sequencing Kit)
- Stop-Lösung (aus Biocycle Sequencing Kit)

Für die Sequenzierreaktion wird folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Komponente	Volumen in µl
Primer	0,5
10 x Klen Therm Puffer	2,1
dITP Mix	2,0
Klen Thermase Sequenase	0,8
Sequenator	5,0
DNA-Template (1-5 µg) + dH ₂ O	10,6
Gesamtvolumen	21

Der Reaktionsansatz wird auf vier Ansätze zu je 5 µl verteilt, jeweils 1 µl einer der vier ddNTP Lösungen zugegeben und nachfolgendes PCR-Programm durchgeführt.

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		95°C	3 Minuten
55 PCR-Zyklen	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Annealing	57°C	10 Sekunden
	Elongation	65°C	35 Sekunden
terminale Elongation		65°C	4 Minuten
Endloskühlschleife		10°C	

Nach dem Ende der PCR werden zu jedem Ansatz 4 µl Stop-Lösung zugegeben.

¹ GATC Manual Biocycle Sequencing Kit

D.2.4.8.1.2 Gellauf mit GATC-Long Run System und Detektion

Das Vorbereiten der Glasplatten, das Gießen des Sequenziergels sowie Vorbereitung und Durchführung des Sequenzierlaufes erfolgen entsprechend den Angaben des GATC-Manuals¹.

Nach Beendigung des Vorlaufes werden die Proben für drei Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Bis zu 3,5 µl Probe können pro Tasche des Sequenziergels aufgetragen werden. Die Nylonmembran wird mit einer Geschwindigkeit von 10 cm/Stunde gestartet, sobald die Farbstofffront aus dem Gel austritt.

Nach Abschluß des Blotts wird die Membran im UV-Stratalinker für 30 Sekunden bestrahlt und anschließend für 20 Minuten bei 80°C getrocknet.

Die Detektion erfolgt mit dem DIG-Nucleic-Acid-Detection Kit entsprechend der Vorschrift². Dabei werden abweichend von der Vorschrift 2,5 µl Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet.

D.2.4.8.2 DNA-Sequenzierung mit dem Li-Cor DNA Sequencer 4000

Das Li-Cor DNA 4000 Sequenziersystem beruht auf der Detektion von laserangeregten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sequenzierprodukten. Das in dieser Arbeit verwendete System benutzt für das Cycle-Sequencing Primer, welche mit dem Farbstoff IRD800 markiert sind. Der Farbstoff wird durch eine Laserdiode mit der Wellenlänge 788 nm angeregt. IR800 hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 795 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 819 nm. Die Detektion erfolgt dabei während der Elektrophorese. Laser und Detektionseinheit des Systems sind auf den unteren Bereich des Polyacrylamidgels gerichtet und detektieren die unterschiedlich langen DNA-Fragmente in den vier Reaktionsansätzen wenn sie an der Laser-Detektionseinheit vorbeiwandern. Mittels der zum System gehörenden Software kann die DNA-Sequenz anschließend ermittelt werden.

Für das Cycle Sequencing wurde das Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Sequencing Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Es enthält vier sog. Basenreagenzien, die sich folgendermaßen zusammensetzen:

G-, A-, T-, C-Basenreagenz (keine näheren Angaben vom Hersteller)	Tris-HCl pH 9,5 MgCl ₂ Tween 20 Nonidet P-40 2-Mercaptoethanol dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP thermostabile Pyrophosphatase ThermoSequenase jeweiliges ddNTP
--	---

Lösungen:

- Plasmid-Lösung
- IRD800-markierte Primer: 2 µM in dH₂O (siehe D.1.8)
- G-, A-, T-, C-Basenreagenzien (aus Sequenzierkit)
- Formamid-EDTA-Fuchsin-Lösung (aus Sequenzierkit)
- DMSO

¹ GATC Manual DNA Sequencer 1500

² Boehringer Mannheim Manual

Für die Sequenzierreaktion wird folgender Reaktionsansatz mit 0,25 pmol DNA-Template hergestellt:

Komponente	Volumen in μl
IRD800-markierter Primer	1,05
DMSO	1,0
DNA-Template + dH ₂ O	18,95
Gesamtvolumen	21

Der Reaktionsansatz wird auf vier Ansätze zu je 5 μl verteilt, jeweils 1,5 μl des G-, A-, T- oder C-Basenreagenz zugegeben und nachfolgendes PCR-Programm durchgeführt.

	Teilzyklus	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung		95°C	2 Minuten
40 PCR-Zyklen	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Annealing	57°C	30 Sekunden
	Elongation	70°C	30 Sekunden
Endloskühl Schleife		10°C	

Nach Abschluß der PCR werden zu jedem Reaktionsansatz 6 μl Formamid-EDTA-Fuchsin-Lösung zugegeben. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenziergel werden die Proben 2 Minuten bei 72 °C denaturiert und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt.

Das Vorbereiten der Glasplatten, das Gießen des 41 cm langen Rapid XL-Sequenziergels und die Vorbereitung des Sequenzierlaufes erfolgen entsprechend den Angaben der Li-Cor Bedienungsanweisung¹. Der Vorlauf erfolgt für 15 Minuten, wobei folgende Limits über das System eingestellt werden:

Spannung: 2000 V
 Stromstärke: 35 mA
 Leistung: 35 W
 Temperatur: 45°C

Anschließend werden in die Probenaschen bis zu 1,5 μl Probe aufgetragen. Der Sequenzierlauf wird mit denselben Parametern wie der Vorlauf durchgeführt, allerdings für eine Dauer von 3-4 Stunden. Die vom System eingescannten Daten können anschließend mit Hilfe der BaseImage IR V. 4.1 Software (siehe D.1.13) ausgewertet werden.

Der kodierende Bereich der HCII-cDNA in den Plasmiden pWTBiI, pHCI Δ C, pHCI Δ C F195C, pHCI Δ C F195C/P52C, pHCI Δ C F195C/G54C und pHCI Δ C F195C/S68C wurde mit den Primern (siehe D.1.8) His-3+/IRD800, Leu110+/IRD800, Met344+/IRD800 und Phe234+/IRD800 sequenziert. Zusätzlich wurde der restliche Teil des 3'-nicht-kodierende Bereiches der HCII-cDNA und der Übergang in den Ausgangsvektor pCDM8 beim Plasmid pWTBiI mit dem Primer HC2/1601+/IRD800 sequenziert.

¹ Licor Manual 1998

D.2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Das Einfügen von DNA in mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren erfolgte mittels der T4 DNA-Ligase. T4 DNA-Ligase stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen T4, wird aber inzwischen rekombinant in *E. coli* hergestellt.

Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von Ribose oder Desoxyribose in doppelsträngiger DNA oder doppelsträngiger RNA¹. Dabei verbindet das Enzym sowohl "blunt ends", als auch "sticky ends". Die Aktivität von T4 Ligase wird häufig in Weiss Units angegeben².

Für die Ligation wird ein Vektor-Insert Verhältnis von 1:3 empfohlen. Die Konzentration der DNA-Fragmente wird dafür densitometrisch geschätzt (siehe D.2.4.5.2) und die Menge an einzusetzendem Insert nach folgender Formel berechnet³:

$$\frac{\text{ng Vektor DNA} \times \text{kB Größe d. Inserts}}{\text{kB Größe d. Vektors}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng Insert DNA}$$

Für die Ligation wird folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Komponente	Volumen	Konzentration im Ansatz
DNA-Fragmente + dH ₂ O	26,0 µl	
10 x Reaktionspuffer (siehe D.1.4.2)	3,0 µl	1 x
T4 DNA-Ligase (10 Weiss Units/µl)	1,0 µl	10 Weiss units/30 µl
Gesamtvolumen	30 µl	

Der Ansatz wird ü. N. in einem Thermocycler jeweils 30 Sekunden abwechselnd bei 10°C und 27°C inkubiert⁴. Die Ligase wird anschließend für 15 Minuten bei 65°C inaktiviert und das Ligationsprodukt in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe D.2.1.3).

¹ Engler & Richardson 1982

² Weiss *et al.* 1968

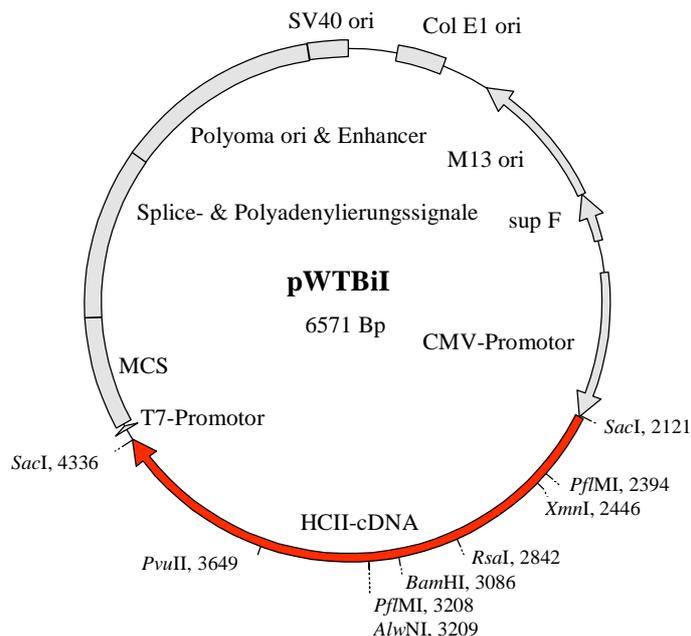
³ Promega 1996

⁴ Lund *et al.* 1996

D.2.4.10 Konstruktion von Plasmiden

Für den Nachweis des allosterischen Aktivierungsmechanismus von HCII durch GAGs sollte rekombinantes HCII produziert werden, in welchem die drei natürlich vorkommenden Cysteine durch Serin ersetzt sind, und bei dem der saure Aminoterminus des Proteins über eine Disulfidbrücke an den Kern des Moleküls gebunden ist. Hierfür sollten zwei neue Cysteinreste in das Molekül eingeführt werden.

Zur Produktion von rekombinantem HCII stand bereits der Shuttle-Vektor pWTBiI¹ zur Verfügung. Bei pWTBiI handelt es sich um ein Derivat des pCDM8 Vektors², in dessen *SacI*-Schnittstelle die, ebenfalls mit *SacI* geschnittene HCII-cDNA, in der für die Expression korrekten Orientierung hinter dem CMV-Promotor³ eingebaut ist.



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- sup F: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyomavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *AlwNI*, *BamHI*, *PflMI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 16: Aufbau und Elemente des pWTBiI Shuttle-Plasmids, sowie relevante Schnittstellen. Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

pWTBiI wurde im *E. Coli*-Stamm MC1061/P3⁴ vermehrt. Dieser Stamm enthält das P3-Plasmid, welches u. a. Resistenzgene gegen Ampicillin/Carbenicillin und Tetracyclin enthält. Beide Gene sind durch eine amber-Mutation unterbrochen. Die durch pWTBiI kodierte amber-Suppressor-tRNA supF ermöglichte durch ein "Überlesen" der amber-Mutationen die Expression der beiden Resistenzgene und diente somit als Selektionsmarker für Bakterien, die mit pCDM8 oder dessen Derivaten transformiert wurden. Für die Expression der HCII-cDNA wurde das COS-Zell System verwendet (siehe D.2.2.6).

pWTBiI diente als Ausgangsvektor für die Konstruktion der verschiedenen HCII Mutanten. Die HCII-cDNA-Mutanten wurden im ersten Schritt über PCR-Mutagenese (siehe D.2.4.2) erzeugt und die PCR-Mutagenese-Produkte z.T. subkloniert (siehe D.2.4.10.1). Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen wurden Teile der HCII-cDNA aus pWTBiI entfernt und durch die veränderten Sequenzen ersetzt (siehe D.2.4.6 und D.2.4.9).

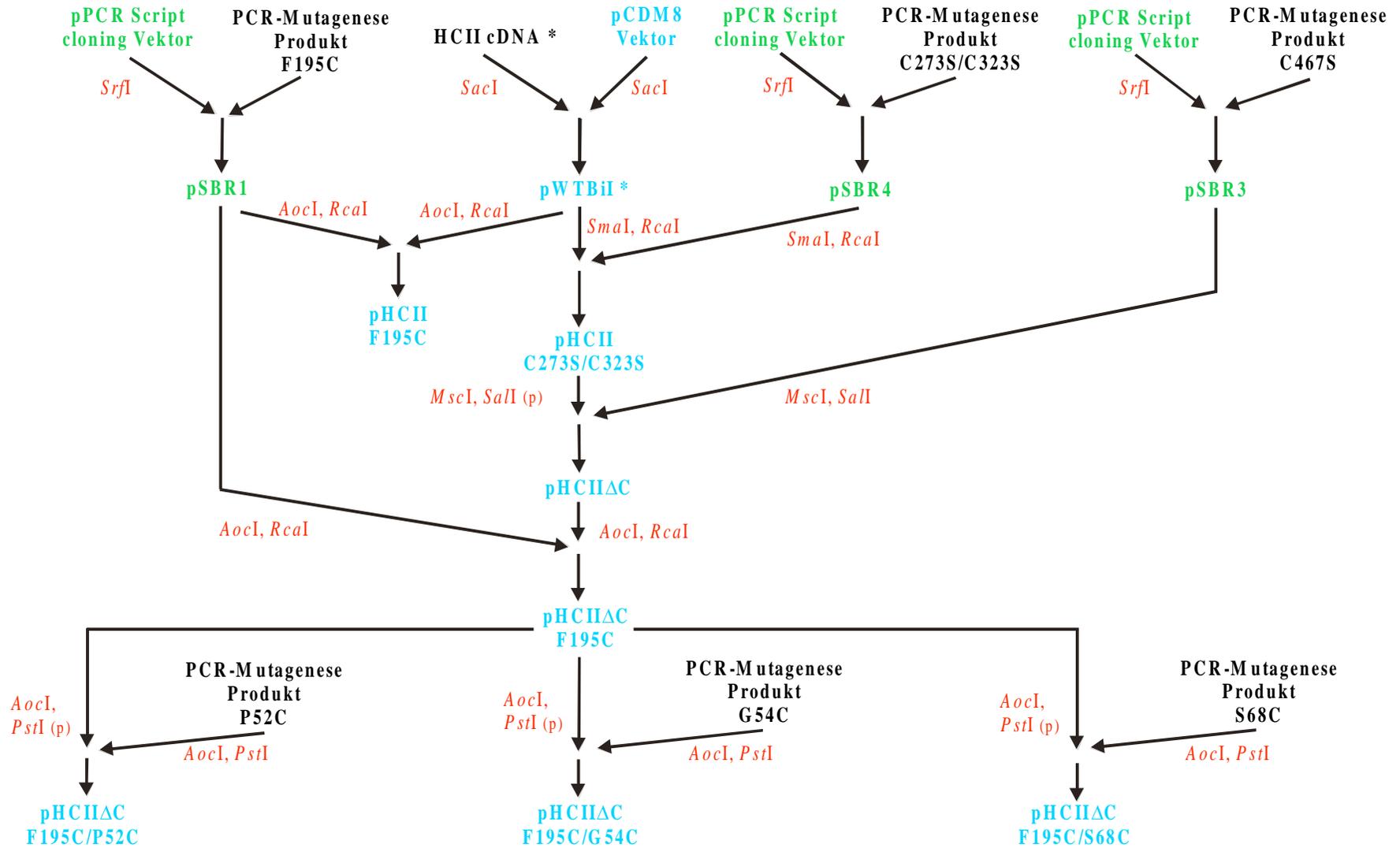
Abbildung 17 auf der nächsten Seite zeigt als Übersichtsdiagramm den "Plasmidstammbaum", der den Entstehungsweg der verwendeten Plasmide unter Auslassung von pSBR21 darstellt.

¹ Ragg *et al.* 1990a

² Seed 1987

³ Boshart *et al.* 1985; Foeking & Hofstetter 1986

⁴ Hanahan 1983



* Ragg, H. et. al. J. Biol. Chem. 1990, **265**: 5211-5218

blaue Schrift : Basisvektor pCDM8 Shuttlevektor
grüne Schrift : Basisvektor pPCR Script cloning Vektor

rot: verwendete Restriktionsendonukleasen
(p) : nur partielle Spaltung durch das Enzym

Abbildung 17: Stammbaum der verwendeten Plasmide (ohne pSBR21). In die Vektoren eingebaut, bzw ausgetauscht wurden jeweils Fragmente der HcII-cDNA.

D.2.4.10.1 Subklonierung von PCR-Mutagenese-Produkten

Die Subklonierung von PCR-Mutagenese-Produkten erfolgte mit Hilfe des pCR-Script™ SK(+) Cloning Kit der Firma Stratagene. Das Kit wurde im Laufe der Arbeit vom Hersteller umbenannt in "pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit", alle Komponenten blieben dabei aber unverändert.

Die Subklonierung stellt gewissermaßen eine "Konservierung" des PCR-Mutagenese-Produktes dar, und ermöglicht es, über eine Plasmidisolierung (siehe D.2.4.4.4) große Mengen des subklonierten PCR-Mutagenese-Produktes zu erhalten.

Das PCR-Produkt wird "blunt end" in den, mit dem Restriktionsenzym *SrfI* linearisierten pCR Script™ SK (+) cloning Vektor (siehe Abbildung 18) ligiert¹. Die Zugabe von *SrfI*² zum Ligationsansatz öffnet dabei religiertes Plasmid wieder, der Einbau von Fremd-DNA in die Schnittstelle zerstört diese. Die *SrfI*-Schnittstelle befindet sich in der multiple cloning site, welche sich wiederum im Lac Z Gen des Vektors befindet. Das Genprodukt des LacZ Gen, das α -Fragment der β -Galaktosidase dient der α -Komplementation des *E. coli* Stammes *Epicurian coli*® XL1-Blue MRF' Kan (siehe D.1.9), welcher somit enzymatisch aktive β -Galaktosidase erzeugen kann und in der Lage ist, Laktose abzubauen. Der Abbau von Laktose ist mit einer Säureproduktion verbunden, welche sich auf EMB-LB-Agar & Amp Platten (siehe D.2.1.1) durch eine Rot-Färbung der Bakterienkolonien manifestiert³. Die Ligation eines PCR-Produktes in das LacZ-Gen führt zu einer Insertionsinaktivierung. LacZ-defiziente Bakterien, die mit einem solche Plasmid transformiert werden, sind nicht in der Lage Laktose abzubauen und erscheinen auf EMB-LB-Agar & Amp Platten weiß. Als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Plasmidtransformation dient das *bla*-Gen, welches Resistenz gegen Ampicillin und Carbenicillin vermittelt.

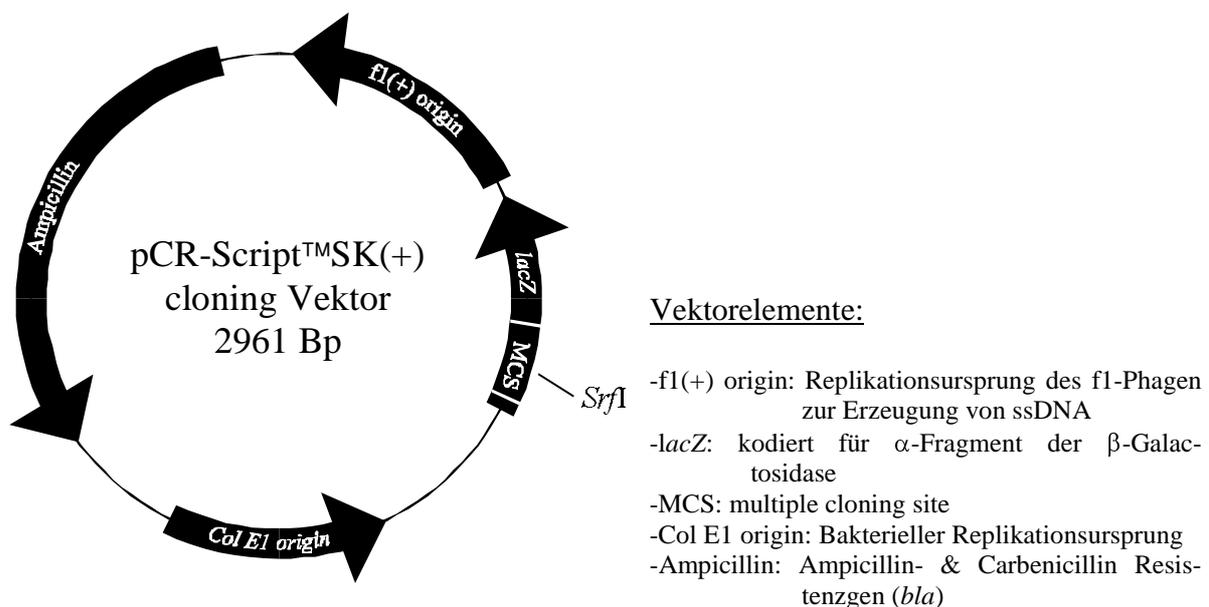


Abbildung 18 : Aufbau des pCR Script SK(+) cloning Vektors

¹ Liu & Schwartz 1992

² Simcox *et al.* 1991

³ Schlegel 1992

Die Ligation der PCR-Mutagenese-Produkte in den Vektor und die Transformation in die bereits superkompetenten *Epicurian coli*[®] XL1-Blue MRF⁺ Kan-Zellen erfolgt entsprechend dem Protokoll des pCR-Script™ SK(+) Cloning Kits¹. Die transformierten Bakterien werden auf EMB-LB-Agar & Amp Platten ausgestrichen (siehe D.2.1.1), weiße Bakterienkolonien am nächsten Tag auf neue Platten übertragen und 3 ml Flüssigkulturen mit LB-Flüssigmedium & Amp (siehe D.2.1.1) hergestellt. Aus den Flüssigkulturen werden die Plasmide mit Hilfe des Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kits isoliert (siehe D.2.4.4.3). Die isolierten Plasmide werden anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese charakterisiert (siehe D.2.4.3). Dabei können Insert-enhaltende Plasmide an ihren langsameren Laufverhalten, im Vergleich zu Plasmiden ohne Insert identifiziert werden.

D.2.4.10.1.1 Konstruktion des Plasmids pSBR1

Für die Konstruktion des Plasmids pSBR1 wurde das PCR-Mutagenese-Produkt mit der Mutation F195C (Austausch des Codons für Aminosäure Phenylalanin 195 gegen ein Codon für Cystein) "blunt end" in den pCR-Script™ SK(+) cloning Vektor ligiert (siehe D.2.4.10.1). Die PCR-Mutagenese nach der Methode von Picard *et al.* (siehe D.2.4.2.1) wurde mit den Primern (siehe D.1.8) HC2/Leu110/+, HC2/Cys195/- und HC2/Leu254/- und dem Template pWTBiI durchgeführt. Das entstehende PCR-Mutagenese-Produkt hatte eine Länge von 434 Bp und unterschied sich von der Ausgangs-DNA durch die Mutation TTT → TGT welche das Codon für Aminosäure Phe195 ändert in Cys195 und eine stille Indikatormutation GGG → GGA im Codon für Aminosäure Gly196 einfügte, welche eine *RsaI* Schnittstelle entfernt. Isolierte Plasmide, die sich in der Agarosegelelektrophorese (siehe D.2.4.3) als "Insert-tragend" herausgestellt hatten, wurden zur Ermittlung der Insert-Orientierung, zur Überprüfung der Indikatormutation und zur Charakterisierung mit den Restriktionsenzymen *RcaI*, *RsaI*, *HindIII* und *AocI* gespalten (siehe D.2.4.6). Die errechneten Fragmentgrößen und die Plasmidkarte von pSBR1 befinden sich im Abschnitt E.2.1.1.

D.2.4.10.1.2 Konstruktion des Plasmids pSBR3

Für die Konstruktion des Plasmids pSBR3 wurde das Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkt mit der Mutation C467S (Austausch des Codons für Aminosäure Cys467 gegen das Codon für Serin) "blunt end" in den pCR-Script™ SK(+) cloning Vektor ligiert (siehe D.2.4.10.1).

Hierfür wurde zunächst das PCR-Mutageneseprodukt durch Overlap-Extension-PCR-Mutagenese (siehe D.2.4.2.2) mit den Primerkombinationen HC2/Glu429/+ und HC2/Ser467/- (PCR-Produkt: 127 Bp) sowie HC2/Ser467/+ und HC2/1813/- (PCR-Produkt 422 Bp) und dem Template pWTBiI hergestellt.

Das entstehende Overlap-PCR-Mutagenese-Produkt hatte eine Länge von 526 Bp und unterschied sich von der Ausgangs-DNA durch die Mutation TGC → TCC, welche das Codon für Aminosäure Cys467 ändert in Ser467 und gleichzeitig eine *PvuII* Schnittstelle entfernt.

Mit isolierten Plasmiden, die sich in der Agarosegelelektrophorese (siehe D.2.4.3) als "Insert-tragend" herausgestellt hatten, wurden zur Ermittlung der Insert-Orientierung, zur Überprüfung der Indikatormutation und zur Charakterisierung Restriktionsspaltungen mit den Restriktionsenzymen *PvuII*, *EcoRI*, *NdeI* und *AlwNI* durchgeführt (siehe D.2.4.6). Die errechneten Fragmentgrößen und die Plasmidkarte von pSBR3 befinden sich im Abschnitt E.2.1.2. Das Insert wurde zusätzlich partiell sequenziert (siehe D.2.4.8.1).

¹ Stratagene Instruction Manual 1994

D.2.4.10.1.3 Konstruktion des Plasmids pSBR4

Für die Konstruktion des Plasmids pSBR4 wurde ein PCR-Mutagenese-Produkt, in dem gleichzeitig die Codons für die beiden Cysteine Cys273 und Cys323 durch Codons für Serin ersetzt waren, "blunt end" in den pCR-Script™ SK(+) cloning Vector ligiert (siehe D.2.4.10.1). Das Overlap-PCR-Mutagenese-Produkt von 490 Bp entstand durch eine Kombination der PCR-Mutagenese nach Picard *et al.* (siehe D.2.4.2.1) und der Overlap-Extension-PCR-Mutagenese (siehe D.2.4.2.2) jeweils mit dem Template pWTBiI wie in Abbildung 19 dargestellt.

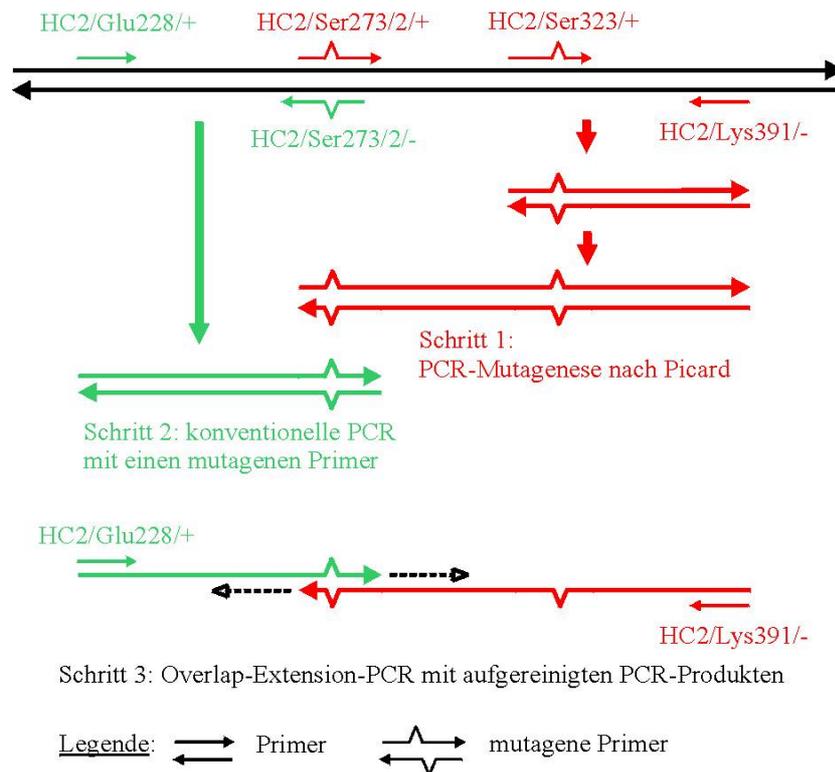


Abbildung 19 : Prinzip der PCR-Mutagenesen für die gleichzeitige Mutation von Cys273 und Cys323

Den ersten Schritt stellte eine PCR-Mutagenese nach Picard *et al.* mit den Primern HC2/Ser273/2/+, HC2/Ser323/+ und HC2/Lys391/- (siehe D.1.8) dar (rot dargestellt in Abbildung 19). Das entstehende PCR-Mutagenese-Produkt hatte eine Länge von 364 Bp und unterschied sich von der Ausgangs-DNA durch folgende Mutationen: Codon für Cys273 (TGC) wird zu Codon für Ser (TCC), Codon für Gly278 (GGA) wird durch stille Mutation zu GGT, wodurch eine *Bam*HI-Schnittstelle entfernt wird, Codon für Cys323 (TGC) wird zu Codon für Ser (TCC) und Codon für Leu321 (CTG) wird durch stille Mutation zu CTA, wodurch gleichzeitig eine *Alw*NI und eine *Pf*MI Schnittstelle entfernt werden.

Den zweiten Schritt stellte eine konventionelle PCR (siehe D.2.4.1) mit *Pfu* DNA-Polymerase und den Primern HC2/Glu228/+ und HC2/Ser273/2/- (siehe D.1.8) dar (grün dargestellt in Abbildung 19). Das in diesem Schritt entstehende PCR-Mutagenese-Produkt mit einer Länge von 163 Bp enthielt eine geeignete Restriktionsschnittstelle für den späteren Einbau in den Expressionsvektor pWTBiI bzw. dessen Derivate und unterschied sich von der Ausgangs-DNA durch die Mutationen TGC → TCC, welche das Codon für die Aminosäure Cys273 zu Ser273 ändert und die stille Indikatormutation GGA → GGT, die im Codon für die Aminosäure Gly278 eine *Bam*HI Schnittstelle entfernt. Die beiden PCR-Mutagenese-Produkte, welche an einem Ende zueinander komplementär sind, wurden mit dem Jetsoorb DNA Gel Extraction Kit (siehe D.2.4.4.1) aufgereinigt. Anschließend wurde eine Overlap-

Extension-PCR (Schritt 3 in Abbildung 19), wie unter Abschnitt D.2.4.2.2 beschrieben mit den beiden Primern HC2/Glu228/+ und HC2/Lys391/- durchgeführt.

Insert enthaltende Plasmide wurden zur Ermittlung der Insert-Orientierung, zur Überprüfung der Indikatormutationen und zur Charakterisierung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Dra*I, *Alw*NI, *Xho*I, *Rca*I und *Sma*I gespalten (siehe D.2.4.6). Die errechneten Fragmentgrößen und die Plasmidkarte von pSBR4 befinden sich im Abschnitt E.2.1.3 Das Insert wurde zusätzlich partiell sequenziert (siehe D.2.4.8.1).

D.2.4.10.2 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Alle Expressionsplasmide mit Ausnahme von pSBR21 (siehe D.2.4.10.3) sind Derivate von pWTBiI (siehe D.2.4.10). Die Ausgangsplasmide und die jeweiligen Inserts wurden mit derselben Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten (siehe D.2.4.6). Teilweise wurden die DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe D.2.4.3) mit Hilfe des Jetsorb DNA Gel Extraction Kit (siehe D.2.4.4.1) gereinigt. Die Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase zum jeweiligen neuen Plasmid ligiert (siehe D.2.4.9), die Plasmide anschließend in kompetente *E. coli* MC1061/P3 Zellen transformiert (siehe D.2.1.3) und die Zellen auf LB-Agar & Carb & Tc Platten (siehe D.2.1.1) aufgebracht. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf neue Platten übertragen und 3 ml Flüssigkulturen mit LB-Flüssigmedium & Carb & Tc (siehe D.2.1.1) hergestellt, aus denen wiederum die Plasmide mit Hilfe des Quantum Prep[®] Plasmid Mini Prep Kits (siehe D.2.4.4.3) für die weitere Charakterisierung isoliert wurden.

Tabelle 11 zeigt die Eigenschaften der HCII-cDNAs in den verschiedenen Expressionsvektoren und die jeweiligen Indikatormutationen. Die Sequenzen der partiell bzw. vollständig sequenzierten cDNAs sind in Abschnitt E.3 dargestellt.

Plasmid	Cys273 ↓ Ser273 <i>Bam</i> HI bei Gly278 entfernt	Cys323 ↓ Ser323 <i>Pf</i> MI & <i>Alw</i> NI bei Leu321 entfernt	Cys467 ↓ Ser467 <i>Pvu</i> II bei Cys467 entfernt	Phe195 ↓ Cys195 <i>Rsa</i> I bei Gly196 entfernt	Pro52 ↓ Cys52 <i>Pf</i> MI bei Thr47 entfernt	Gly54 ↓ Cys54 <i>Pf</i> MI bei Thr47 entfernt	Ser68 ↓ Cys68 <i>Xmn</i> I bei Phe67 entfernt
pWTBiI	-	-	-	-	-	-	-
pHCII F195C	-	-	-	+	-	-	-
pHCII C273S/C323S	+	+	-	-	-	-	-
pHCIIΔC	+	+	+	-	-	-	-
pHCIIΔC F195C	+	+	+	+	-	-	-
pHCIIΔC F195C/P52C	+	+	+	+	+	-	-
pHCIIΔC F195C/G54C	+	+	+	+	-	+	-
pHCIIΔC F195C/S68C	+	+	+	+	-	-	+

Tabelle 11: Eigenschaften einschließlich der jeweiligen Indikatormutationen der HCII-cDNA-Varianten in den verschiedenen Expressionsvektoren. Der Pfeil (↓) kennzeichnet jeweils die Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins von der Ausgangsaminosäure (oberhalb des Pfeils) zur neuen Aminosäure (unterhalb des Pfeils). Für cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII siehe H.1.

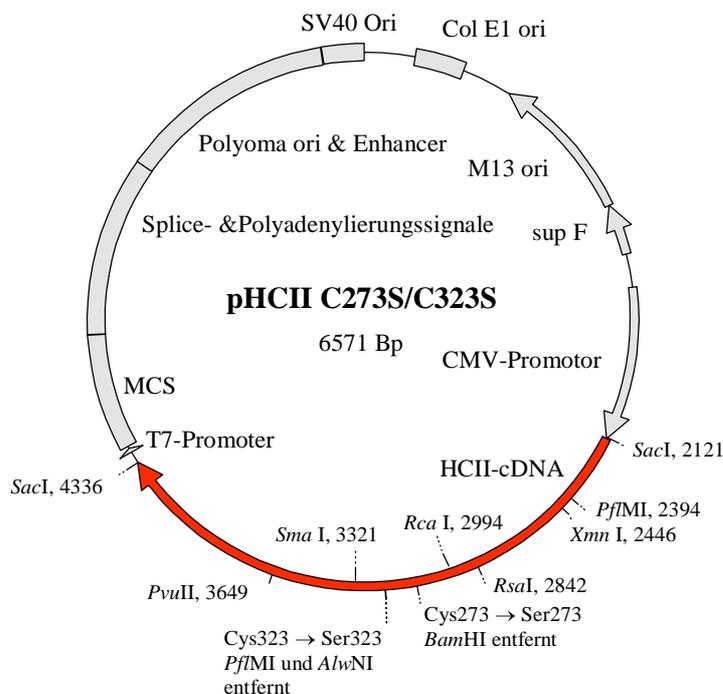
Die von diesen Plasmiden codierten rekombinanten Proteine werden analog zur Bezeichnung der Plasmide als Wildtyp (WT) HCII, HCII F195C, HCII C273S/C323S, HCIIΔC, HCIIΔC F195C, HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C bezeichnet.

D.2.4.10.2.1 Konstruktion des Plasmids pHCI C273S/C323S

pHCI C273S/C323S enthält eine HCI-cDNA, bei der die Codons für die Aminosäuren Cys273 und Cys323 durch Codons für Serin ersetzt sind.

Ausgangsvektoren für pHCI C273S/C323S waren pWTBiI (siehe D.2.4.10) und pSBR4 (siehe D.2.4.10.1.3). Letzterer enthält die Mutationen Cys273 → Ser273 und Cys323 → Ser323 sowie die Indikatormutationen, die je eine *AlwNI*, *PflMI* und *BamHI* Stelle entfernen. Für die Konstruktion von pHCI C273S/C323S wurden die beiden singulären *SmaI* und *RcaI* Schnittstellen im Plasmid pWTBiI (siehe Abbildung 16) genutzt. Dazu wurden pWTBiI und pSBR4 jeweils mit *SmaI* und *RcaI* in einem Doppelverdau mit Puffer 4 gespalten (zur Restriktionsspaltung siehe D.2.4.6). Da *SmaI* ein Temperaturoptimum von 25 °C hat, wurde zuerst 40 Minuten bei 25°C inkubiert, anschließend 40 Minuten bei 37°C. Danach wurden die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65°C inaktiviert. pWTBiI wurde durch *SmaI* und *RcaI* in zwei Fragmente von 329 Bp und 6242 Bp gespalten. Das 329 Bp-Fragment wurde anschließend durch das entsprechende 329 Bp-Fragment aus pSBR4, welches die gewünschten Mutationen und Indikatormutationen enthielt, ersetzt. pSBR 4 wurde durch *RcaI* und *SmaI* in fünf Fragmente von 72, 329, 795, 1008 und 1247 Bp gespalten.

Für die Ligation (siehe D.2.4.9) wurden als DNA-Fragmente die ungereinigten Restriktionsansätze der beiden Restriktionsspaltungen verwendet. Die Methode hatte den Nachteil, daß neben den gewünschten Plasmiden auch ungewünschte Ligationsprodukte entstanden, so daß pHCI C273S/C323S unter einer Vielzahl von Klonen gesucht werden mußte. In Vorversuchen war es jedoch nicht gelungen, Fragmente, die mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit isoliert waren zu ligieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Grund hierfür dürfte darin liegen, daß das Jetsorb DNA Gel Extraction Kit mit einer Kieselgel-Lösung arbeitet, von der sich vermutlich Reste in der gereinigten DNA befanden. Es ist bekannt, daß Kieselgel sich störend auf enzymatische Reaktionen auswirkt¹.



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promoter: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCI-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyomavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *AlwNI*, *BamHI*, *PflMI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 20 : Aufbau und Elemente des Plasmids pHCI C273S/C323S.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

¹ Qiagen News 1997, Qiagen Guide 1994

Die ligierten Plasmide wurden wie beschrieben (siehe D.2.4.10.2) transformiert und korrekte pHCIIC273S/C323S Plasmide anhand der eingeführten Indikatormutationen durch Restriktionsspaltungen mit *Bam*HI und *Alw*NI identifiziert.

Die weitere Charakterisierung von pHCIIC273S/C323S erfolgte durch Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) mit *Sma*I, *Rca*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Msc*I und *Sal*I. Die errechneten Fragmentgrößen sind in im Abschnitt E.2.2 dargestellt. Das Insert wurde zusätzlich sequenziert (siehe D.2.4.8.1).

pHCIIC273S/C323S unterscheidet sich von pWTBIIC durch folgende Mutationen:

- Cys273 → Ser273, Indikatormutation im Codon für Gly 278 entfernt *Bam*HI Schnittstelle
- Cys323 → Ser323, Indikatormutation im Codon für Leu 321 entfernt *Alw*NI und *Pf*MI Schnittstellen

D.2.4.10.2 Konstruktion des Plasmids pHCIIC

pHCIIC enthält eine HCII-cDNA, bei der die Codons für die drei natürlich im HCII vorkommenden Cysteine durch Codons für Serin ersetzt sind.

Ausgangsvektoren für die Konstruktion von pHCIIC273S/C323S waren pHCIIC273S/C323S (siehe D.2.4.10.2.1) und pSBR3 (siehe D.2.4.10.1.2). Letzteres enthält das PCR-Mutagenese-Produkt mit der Mutation Cys467 → Ser467 und mit der Mutation verbunden die Entfernung einer *Pvu*II-Schnittstelle.

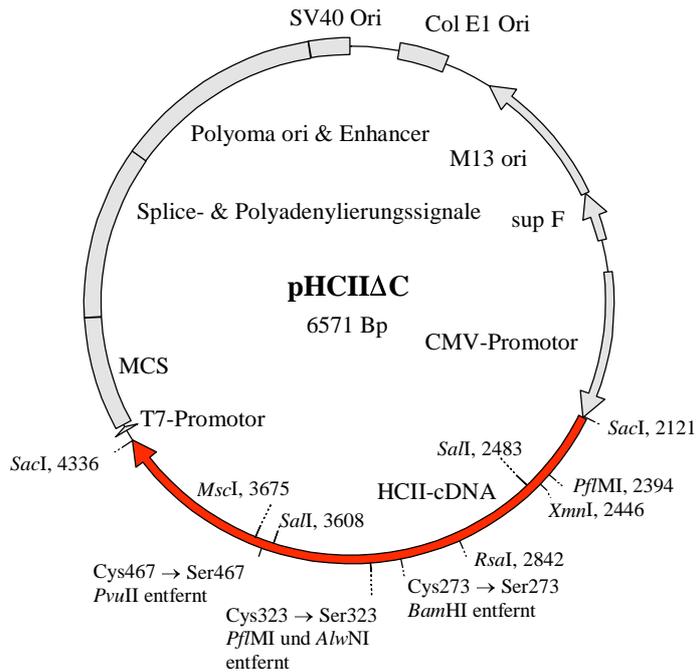
pSBR3 und pHCIIC273S/C323S wurden im ersten Schritt jeweils für 60 Minuten bei 37°C in Puffer 2 mit *Msc*I gespalten (zur Restriktionsspaltung siehe D.2.4.6). Anschließend wurde zu beiden Reaktionsansätzen 2 M NaCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 150 mmol/l, (der optimalen Salzkonzentration für *Sal*I) zugegeben, sowie 1/100 Volumen 100 x BSA-Lösung (siehe D.1.4.1). Nach der Zugabe von *Sal*I zum pSBR3-Ansatz wurde dieser erneut 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. pSBR 3 wurde durch diese Behandlung in drei Fragmente von 2978, 440 und 69 Bp gespalten. Das 69 Bp-Fragment enthielt die Mutation Cys467 → Ser467 und die *Pvu*II Indikatormutation und wurde in den mit *Sal*I und *Msc*I geschnittenen Vektor pHCIIC273S/C323S ligiert.

Da pHCIIC273S/C323S zwei Schnittstellen für *Sal*I besitzt, mußte nach der *Msc*I-Spaltung eine partielle Spaltung mit *Sal*I durchgeführt werden. Hierfür wurden 20 Units *Sal*I zum pHCIIC273S/C323S Reaktionsansatz gegeben und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. In Vorversuchen hatten sich diese Bedingungen für eine partielle Spaltung als geeignet erwiesen.

pHC273S/C323S wurde durch diese Doppelspaltung bei einer vollständigen *Sal*I Spaltung in drei Fragmente von 1125, 5377 und 69 Bp zerlegt. Bei partieller *Sal*I Spaltung des Vektors entstanden jeweils zwei Fragmente: a) entweder 1194 Bp und 5377 Bp oder b) die beiden gewünschten Fragmente von 6502 Bp und 69 Bp, wobei das 69 Bp Fragment gegen das entsprechende Fragment aus pSBR3 ausgetauscht wurde.

Für die Ligation (siehe D.2.4.9) wurden erneut die ungereinigten Restriktionsansätze der beiden Restriktionsspaltungen verwendet. Die ligierten Plasmide wurden wie beschrieben (siehe D.2.4.10.2) transformiert und isolierte pHCIIC Plasmide anhand der eingeführten Indikatormutation durch Restriktionsspaltung mit *Pvu*II identifiziert.

Die weitere Charakterisierung von pHCIIC erfolgte durch Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) mit *Pvu*II, *Bam*HI, *Msc*I, *Rca*I, *Sal*I, *Alw*NI, *Sma*I, *Rsa*I, *Nco*I, *Pf*MI, *Eco*RI und *Xmn*I. Die errechneten Fragmentgrößen sind im Abschnitt E.2.2 dargestellt. Der codierende Bereich der cDNA wurde zudem sequenziert (siehe D.2.4.8.2).



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyomavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *AlwNI*, *BamHI*, *PflMI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 21: Aufbau und Elemente von pHCIIΔC.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

pHCIIΔC unterscheidet sich von pWTBiI durch folgende Mutationen:

- Cys273 → Ser273, Indikatormutation im Codon für Gly278 entfernt *BamHI* Schnittstelle
- Cys323 → Ser323, Indikatormutation im Codon für Leu321 entfernt die Schnittstellen für *AlwNI* und *PflMI*.
- Cys467 → Ser467 mit gleichzeitiger Entfernung einer *PvuII* Schnittstelle

D.2.4.10.2.3 Konstruktion des Plasmids pHCIIΔC F195C

Lösungen:

- L → B* -Lösung 20-fach: 2 M NaCl
20 mM 2-Mercaptoethanol

pHCIIΔC F195C enthält eine HCII-cDNA, bei welcher die Codons für die drei natürlich im HCII vorkommenden Cysteine (Positionen 273, 323, 467) durch Codons für Serin ersetzt sind. Zusätzlich ist an Aminosäureposition 195 Phenylalanin zu Cystein mutiert.

Ausgangsvektoren zur Konstruktion von pHCIIΔC F195C waren die Plasmide pHCIIΔC (siehe D.2.4.10.2.2) und pSBR1 (siehe D.2.4.10.1.1). Letzteres enthält das PCR-Mutagenese-Produkt für die Mutation Phe195 → Cys195 und eine zerstörte *RsaI* Schnittstelle als Indikatormutation. Für die Konstruktion von pHCIIΔC F195C wurden die beiden singulären *AocI* und *RcaI* Schnittstellen in pHCIIΔC benutzt.

Beide Ausgangsplasmide wurden im ersten Schritt für 4 Stunden bei 37 °C in Puffer L mit *AocI* gespalten (zur Restriktionsspaltung siehe D.2.4.6). Anschließend wurde zu beiden Ansätzen jeweils 1/20 Volumen L → B*-Lösung zugegeben, welche Puffer L in Puffer B* verwandelt, der sich nur geringfügig von Puffer B unterscheidet. Nach Zugabe von *RcaI* zu den Reaktionsansätzen wurde erneut für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

pHCIIΔC wurde durch diese Doppelspaltung in zwei Fragmente von 6272 Bp und 299 Bp gespalten. Das 299 Bp-Fragment wurde anschließend durch das entsprechende Fragment aus pSBR1, welches die gewünschte Mutation und die Indikatormutation enthält, ersetzt.

pSBR 1 wurde durch die Doppelspaltung in 4 Fragmente von 299, 1167, 1008 und 921 Bp gespalten. Die Spaltprodukte beider Restriktionsspaltungen wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe D.2.4.3) und das 6272 Bp-Fragment aus pHCIIΔC sowie das 299 Bp-Fragment aus pSBR 1 mit Hilfe des Jetsorb Gel Extraction Kits (siehe D.2.4.4.1) isoliert. Die gereinigten Fragmente wurden zu pHCIIΔC F195C ligiert (siehe D.2.4.9).

Die ligierten Plasmide wurden wie beschrieben (siehe D.2.4.10.2) transformiert und isolierte pHCIIΔC F195C Plasmide anhand der eingeführten Indikatormutation durch Restriktionsspaltungen mit *RsaI* identifiziert.

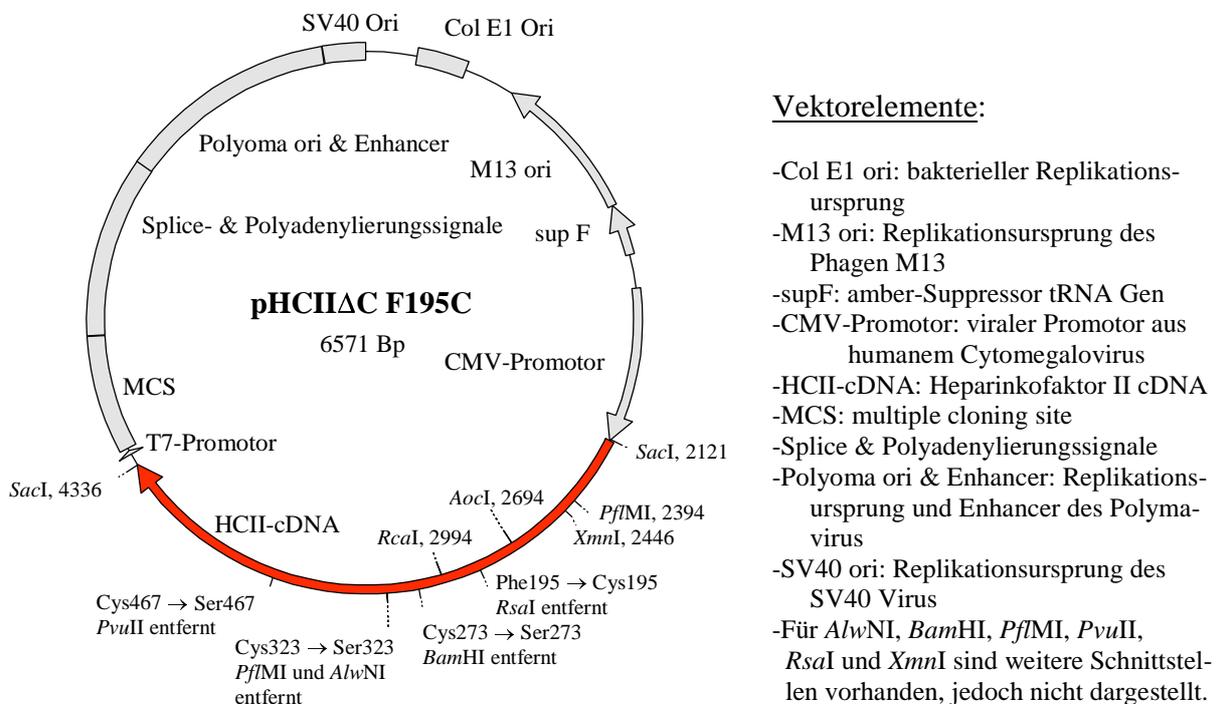


Abbildung 22: Aufbau und Elemente von pHCIIΔC F195C.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

Die weitere Charakterisierung von pHCIIΔC F195C erfolgte durch Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) mit *RsaI*, *SmaI*, *BamHI*, *AlwNI*, *PvuII*, *Sac I*, *RcaI*, *AocI*, *PflMI*, *NcoI*, *XmnI* und *Pst I*. Die errechneten Fragmentgrößen befinden sich im Abschnitt E.2.2. Der codierende Bereich der cDNA wurde zudem sequenziert (siehe D.2.4.8.2).

pHCII Δ C F195C unterscheidet sich von pWTBiI durch folgende Mutationen:

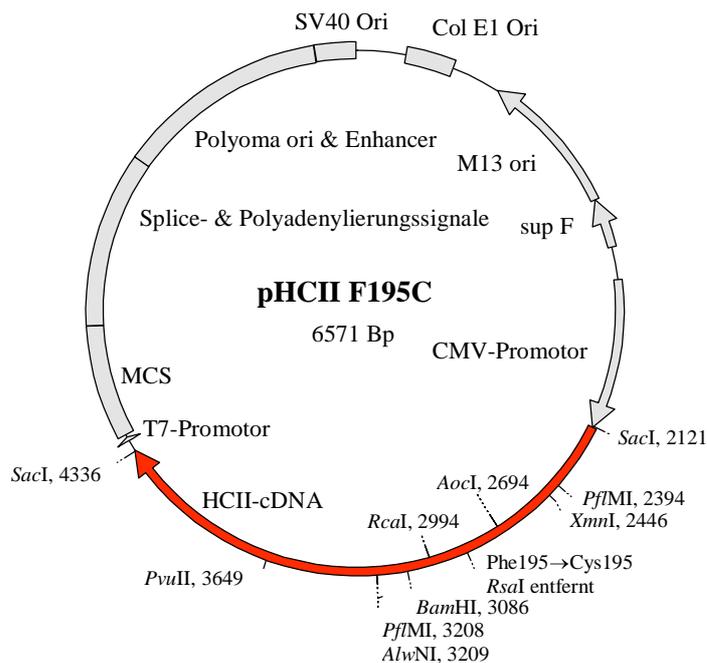
- Cys273 → Ser273, Indikatormutation im Codon für Gly278 entfernt *Bam*HI Schnittstelle
- Cys323 → Ser323, Indikatormutation im Codon für Leu321 entfernt *Alw*NI und *Pfl*MI Schnittstellen
- Cys467 → Ser467 mit gleichzeitiger Entfernung einer *Pvu*II Schnittstelle
- Phe195 → Cys195, Indikatormutation im Codon für Gly196 entfernt *Rsa*I Schnittstelle

D.2.4.10.2.4 Konstruktion des Plasmids pHCII F195C

pHCII F195C enthält eine HCII-cDNA in der das Codon für Phenylalanin 195 durch ein Codon für Cystein ersetzt ist und eine stille Indikatormutation im Codon für Glycin 196, welche eine *Rsa*I Schnittstelle entfernt.

Ausgangsvektoren für die Konstruktion von pHCII F195C waren die Plasmide pWTBiI (siehe D.2.4.10) und pSBR1 (siehe D.2.4.10.1.1).

Die Konstruktion von pHCII F195C erfolgte analog zur Konstruktion von pHCII Δ C F195C, die Plasmide wurden allerdings in einem Doppelverdau mit *Rca*I und *Aoc*I für 5 Stunden mit Puffer L inkubiert und die die Spaltprodukte unaufgereinigt in die Ligation (siehe D.2.4.9) eingesetzt.



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyomavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *Alw*NI, *Bam*HI, *Pfl*MI, *Pvu*II, *Rsa*I und *Xmn*I sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 23: Aufbau und Elemente von pHCII F195C.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

Die Charakterisierung von pHCII F195C erfolgte durch Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) mit *Rsa*I, *Bam*HI, *Rca*I, *Aoc*I und *Dra*I. Die errechneten Fragmentgrößen befinden sich im Abschnitt E.2.2. Das Insert wurde zusätzlich sequenziert (siehe D.2.4.8.1).

pHCII F195 C unterscheidet sich von pWTBiI durch folgende Mutationen:

- Phe195 → Cys195, Indikatormutation im Codon für Gly196 entfernt *Rsa*I Schnittstelle

D.2.4.10.2.5 Konstruktion der Plasmide pHCIIDC F195C/P52C, pHCIIDC F195C/G54C und pHCIIDC F195C/S68C

Alle drei Plasmide leiten sich von pHCIIDC F195C ab (siehe D.2.4.10.2.3). Es wurde jeweils ein Codon für Cystein anstatt der Codons für die Aminosäuren Pro52, Gly54 bzw. Ser68 eingebaut. Die HCII-cDNAs kodieren somit für Proteine, bei denen a) die drei natürlich vorkommenden Cysteine in den Aminosäurepositionen 273, 323 und 467 durch Serine ersetzt sind, die b) in Aminosäureposition 195 ein Cystein statt eines Phenylalanin tragen und c) jeweils ein weiteres Cystein in den Aminosäurepositionen 52 oder 54 oder 68 enthalten.

pHCIIDC F195C wurde im ersten Schritt partiell mit *PstI* gespalten. Hierfür wurde pHCIIDC F195C in einem 20 µl Reaktionsansatz mit Puffer B und 1 Unit *PstI* für 10 Minuten bei Raumtemperatur gespalten (zur Restriktionsspaltung siehe D.2.4.6). Die Spaltprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe D.2.4.3) und die 6571 Bp große linearisierte Form von pHCIIDC F195C mit Hilfe des Jetsorb DNA Gel Extraction Kits isoliert (siehe D.2.4.4.1).

Das gereinigte linearisierte Plasmid wurde anschließend für 3 Stunden bei 37 °C in Puffer L mit *AocI* gespalten und das Spaltprodukt erneut elektrophoretisch aufgetrennt. Je nachdem, welche der beiden *PstI* Schnittstellen im ersten Schritt gespalten wurde, ergaben sich DNA-Fragmente von 2154 Bp und 4417 Bp oder die gewünschten Fragmentgrößen 6187 Bp und 384 Bp. Das 6187 Bp-Fragment wurde mit Hilfe des Jetsorb DNA Gel Extraction Kits isoliert.

Inserts zur Ligation mit dem partiell mit *PstI* und *AocI* geschnittenen 6187 Bp großen pHCIIDC F195C Fragment waren drei Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkte (siehe D.2.4.2.2) von jeweils 384 Bp, die ebenfalls mit *PstI* und *AocI* geschnitten waren.

Tabelle 12 zeigt die verwendeten Primer (siehe D.1.8), die Größe und die Eigenschaften der drei verwendeten Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkte. Template war jeweils pWTBiI.

		Mutagenese- produkt Pro52 → Cys52	Mutagenese- produkt Gly54 → Cys54	Mutagenese- produkt Ser68 → Cys68
PCR-Produkt 1	Primer 1	NcoI-Gly1	NcoI-Gly1	NcoI-Gly1
	Primer 2	HC2/Cys52/-	HC2/Cys54/-	HC2/Ser68/-
	Größe PCR-Produkt	183 Bp	189 Bp	238 Bp
PCR-Produkt 2	Primer 1	HC2/Cys195/-	HC2/Cys195/-	HC2/Cys195/-
	Primer 2	HC2/Cys52/+	HC2/Cys54/+	HC2/Cys68/+
	Größe PCR-Produkt	460 Bp	460 Bp	403 Bp
Größe Overlap-PCR-Produkt		613Bp	613 Bp	613 Bp
Mutation		Pro52 → Cys52 CCA → TGT	Gly54 → Cys54 GGG → TGT	Ser68 → Cys68 AGT → TGT
stille Indikatormutation		Thr 47 ACC → ACT <i>PfI</i> MI entfernt	Thr 47 ACC → ACT <i>PfI</i> MI entfernt	Phe 67 TTC → TTT <i>XmnI</i> entfernt

Tabelle 12: verwendete Primer und Eigenschaften der drei Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkte, welche zur Herstellung von pHCIIDC F195C/P52C, pHCIIDC F195C/G54C und pHCIIDC F195C/S68C dienen.

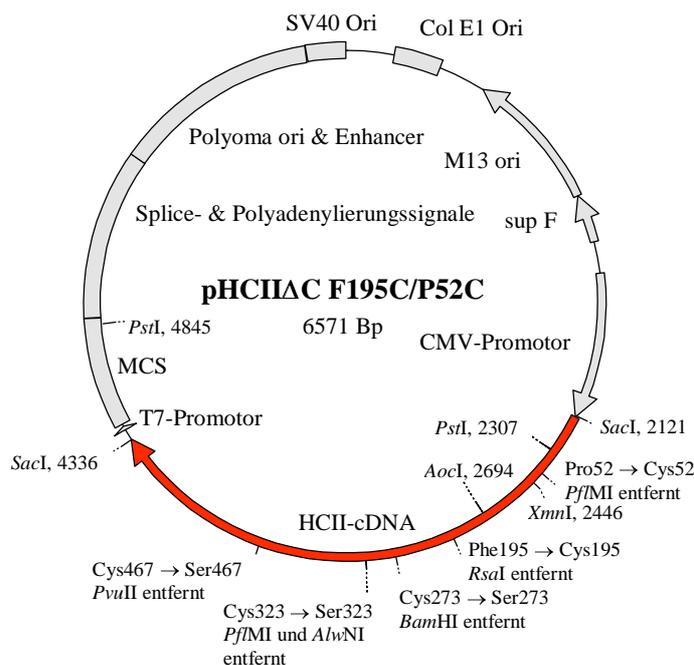
Die PCR-Mutagenese-Produkte wurden mit dH₂O auf das doppelte Volumen ergänzt, Restriktionspuffer 3 und *Pst*I zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In Vorversuchen, in denen die PCR-Mutagenese-Produkte vor der *Pst*I Spaltung mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit gereinigt wurden, konnte keine *Pst*I Spaltung erreicht werden, wahrscheinlich aufgrund von Verunreinigungen durch Kieselgel, welches vermutlich *Pst*I inhibierte. Die Spaltprodukte wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und die entstandenen 541 Bp Banden mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit isoliert (siehe D.2.4.4.1). Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend mit *Aoc*I für 2,5 Stunden gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und die *Aoc*I-*Pst*I Spaltprodukte mit einer Größe von 384 Bp mit dem Jetsorb DNA Gel Extraction Kit isoliert. In drei parallelen Ansätzen wurde das gereinigte *Pst*I-*Aoc*I-pHCIIΔC F195C-Fragment mit je einem der drei mit *Aoc*I & *Pst*I geschnittenen und gereinigten Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkte zu den drei Plasmiden pHCIIΔC F195C/P52C, pHCIIΔC F195C/G54C und pHCIIΔC F195C/S68C ligiert (siehe D.2.4.9).

Alle drei Plasmide unterscheiden sich von pWTBiI durch folgende gemeinsame Eigenschaften: (siehe auch Abbildung 24 bis Abbildung 26)

- Cys273 → Ser273, Indikatormutation im Codon für Gly278 entfernt *Bam*HI Schnittstelle
- Cys323 → Ser323, Indikatormutation im Codon für Leu321 entfernt *Alw*NI und *Pf*MI Schnittstellen
- Cys467 → Ser467 mit gleichzeitiger Entfernung einer *Pvu*II Schnittstelle
- Phe195 → Cys195, Indikatormutation im Codon für Gly196 entfernt *Rsa*I Schnittstelle

Zusätzlich haben die drei Plasmide noch folgende Eigenschaften:

- pHCIIΔC F195C/P52C: Pro52 → Cys52: Indikatormutation in Thr47 entfernt *Pf*MI Schnittstelle
- pHCIIΔC F195C/G54C: Gly54 → Cys54: Indikatormutation in Thr47 entfernt *Pf*MI Schnittstelle
- pHCIIΔC F195C/S68C: Ser68 → Cys68: Indikatormutation in Phe67 entfernt *Xmn*I Schnittstelle

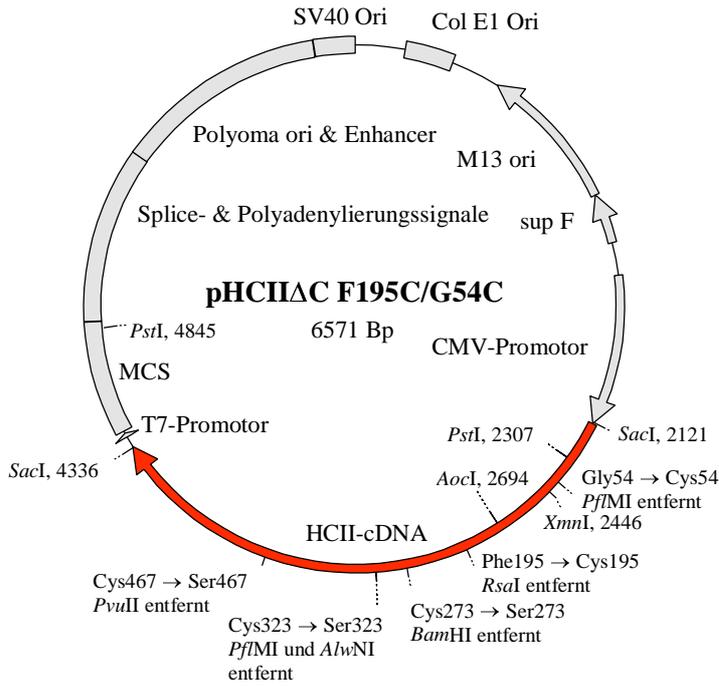


Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *Alw*NI, *Bam*HI, *Pf*MI, *Pvu*II, *Rsa*I und *Xmn*I sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 24: Aufbau und Elemente von pHCIIΔC F195C/P52C.

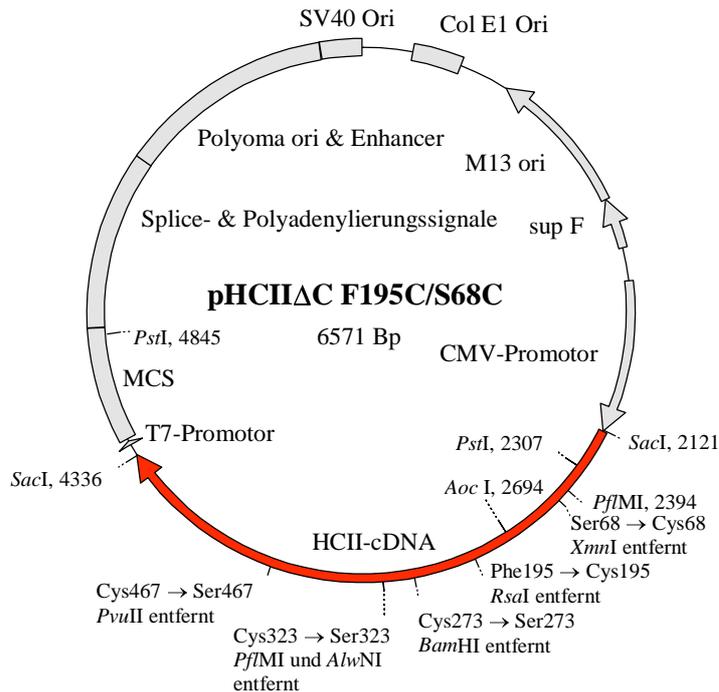
Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice- & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *AlwNI*, *BamHI*, *PfuI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 25: Aufbau und Elemente von pHCIΔC F195C/G54C. Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice- & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polyavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *AlwNI*, *BamHI*, *PfuI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 26: Aufbau und Elemente von pHCIΔC F195C/S68C. Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

Die ligierten Plasmide wurden wie beschrieben (siehe D.2.4.10.2) transformiert und isolierte Plasmide anhand der eingeführten Indikatormutationen durch Restriktionsspaltungen mit *PfuI* bzw. *XmnI* identifiziert.

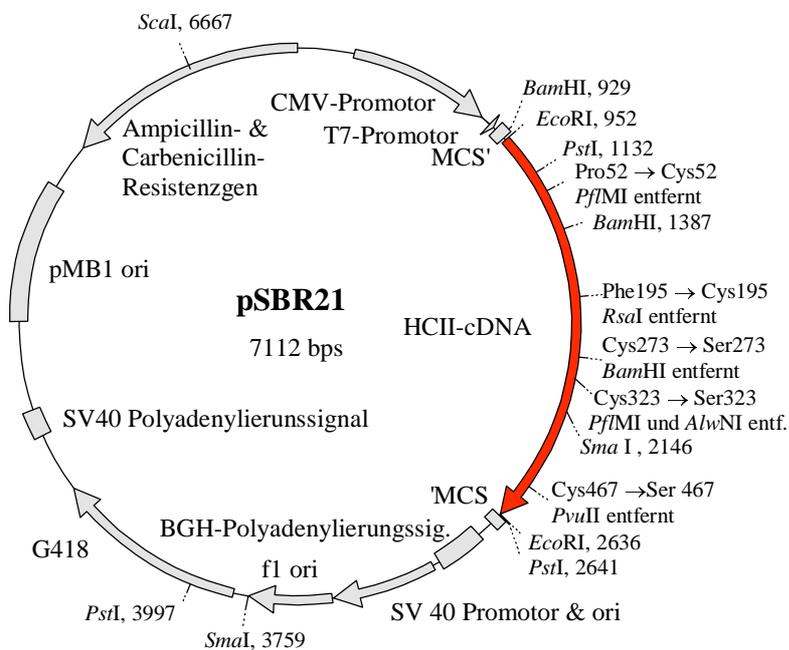
Die weitere Charakterisierung der drei Plasmide erfolgte durch Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) mit *BamHI*, *PvuII*, *AocI*, *PfuI*, *NcoI*, *XmnI*, und *PstI*. Die errechneten Fragmentgrößen sind im Abschnitt E.2.2 aufgelistet. Der codierende Bereich der cDNAs wurde zudem sequenziert (siehe D.2.4.8.2).

D.2.4.10.3 Konstruktion des Plasmids pSBR21

Für die Konstruktion von pSBR21 wurde pHCIΔC F195C/P52C mit *EcoRI* gespalten und das Fragment mit der HCII-cDNA in den ebenfalls mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pcDNA3.1 (+) ligiert.

pcDNA 3.1(+) ist ein Shuttle-Expressionsvektor mit einer Größe von 5428 Bp¹. Er besitzt für das bakterielle System einen pMB1 Replikationsursprung sowie ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Die zu exprimierende DNA wird so in die multiple cloning site des Vektors eingebaut, daß sie unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors² exprimiert wird. Als Selektionsmarker für das eukaryotische System besitzt der Vektor ein Gen, welches Resistenz gegen Neomycin und G418 vermittelt. Das Gen codiert für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase³. Weitere Vektorelemente sind in Abbildung 27 dargestellt.

pcDNA3.1(+) wurde mit *EcoRI* linearisiert (siehe D.2.4.6) und anschließend dephosphoryliert (siehe D.2.4.7). pHCIΔC F195C/P52C wurde ebenfalls mit *EcoRI* gespalten, wodurch zwei Fragmente von 4887 Bp und 1684 Bp entstanden. Die beiden Schnittstellen liegen in den 5'- bzw. 3'-nicht-kodierenden Bereichen der HCII-cDNA von pHCIΔC F195C/P52C. Beide Spaltungsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe D.2.4.3) und der linearisierte pcDNA 3.1(+) Vektor, sowie das HCII-cDNA enthaltende 1684 Bp-Fragment aus pHCIΔC F195C/P52C mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (siehe D.2.4.4.2) aufgereinigt und zu pSBR21 ligiert (siehe D.2.4.9). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* XI 1-Blue Zellen transformiert (siehe D.2.1.3) und die Zellen auf LB & Amp-Platten (siehe D.2.1.1) ausplattiert. Isolierte Plasmide (siehe D.2.4.4.3) aus Flüssigkulturen der gewachsenen Einzelkolonien wurden mit den Restriktionsendonucleasen *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *ScaI* und *SmaI* auf korrektes Schnittmuster und korrekte Insertorientierung für die Expression untersucht.



Vektorelemente:

- pMB1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- Ampicillin- & Carbenicillin-Resistenzgen
- CMV-Promotor: Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- T7-Promotor: Promotor des Bakteriophagen T7
- MCS, MCS': multiple cloning site Fragmente
- HCII-cDNA: *EcoRI* Fragment der HCII-cDNA aus pHCIΔC F195C/P52C
- BGH-(bovine growth hormone) Polyadenylierungssignal
- f1 ori: Replikationsursprung des f1-Phagen
- G418: Resistenzgen gegen Neomycin und G418
- SV 40 Polyadenylierungssignal

Abbildung 27: Aufbau und Elemente von pSBR21

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar. Für *AlwNI*, *PvuII*, *RsaI* und *XmnI* sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

¹ Invitrogen Manual 1999

² Boshart *et al.* 1985; Foecking & Hofstetter 1986

³ Southern & Berg 1982

D.2.5 Proteinbiochemische Methoden

D.2.5.1 ELISA

Die ELISA-Technik (**e**nzyme **l**inked **i**mmunosorbent **a**ssay) kombiniert die hohe Spezifität der Antigen-Antikörperreaktion mit der Empfindlichkeit eines enzymatischen Tests¹. Hierbei ist einer der verwendeten Antikörper mit einem Enzym gekoppelt, welches eine Chromogen-Umwandlung katalysiert. Das lösliche und farblose Chromogen wird dabei durch das Enzym zu einem löslichen und quantifizierbaren Farbstoff umgewandelt. Die Menge an entstehendem Farbstoff ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundenem Antigen.

Die Detektion von HCII wurde im sogenannten Sandwich-ELISA durchgeführt.

Der ELISA beginnt mit der Immobilisierung eines 1. Antikörpers (Fangantikörper) gegen HCII auf einer Mikrotiterplatte und einer anschließenden Blockierung freier Bindungsstellen mit BSA. Der 1. Antikörper ist in der Lage, selektiv das relevante gelöste Antigen, hier HCII, zu binden, so daß alle anderen nicht gebundenen Komponenten abgewaschen werden können. Wichtig ist dabei die, durch den Fangantikörper bedingte Anreicherung des Antigens, wodurch eine deutliche Steigerung der Nachweisempfindlichkeit erreicht wird. Nach dem Binden des Antigens an den 1. Antikörper wird ein Enzym-markierter 2. Antikörper gegen des Antigen zugegeben, welcher wiederum spezifisch an HCII bindet. Der verwendete 2. Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP) gekoppelt. HRP katalysiert in der anschließenden Farbreaktion in Gegenwart von H₂O₂ die Oxidation des farblosen Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB)² zu einem blauen Radikal-Kation, welches durch die Zugabe von Säure zu einem gelben Diphenochinon-Farbstoff oxidiert wird, der photometrisch bei 405 nm meßbar ist. Die Quantifizierung von HCII erfolgt über eine Verdünnungsreihe von Standard-Humanplasma mit definierten Konzentrationen von HCII.

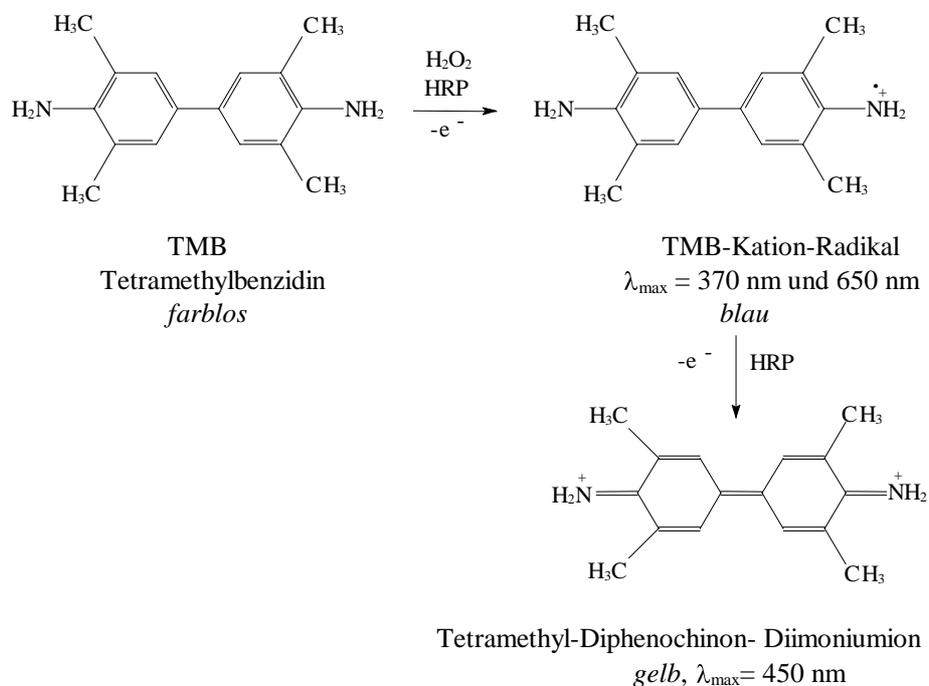


Abbildung 28: TMB-Farbreaktion

¹ Engvall & Perlman 1971

² Porstman & Porstman 1988

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer	MSTB-Puffer
B	HCII-Standard 3 µg/ml		HCII-Standard 1 µg/ml		HCII-Standard 0,33 µg/ml		HCII-Standard 0,11 µg/ml		HCII-Standard 0,037 µg/ml		HCII-Standard 0,012 µg/ml	
C	3 µg/ml		1 µg/ml		0,33 µg/ml		0,11 µg/ml		0,037 µg/ml		0,012 µg/ml	
D	P 1 1:2	P 2 1:2	P 3 1:2	P 4 1:2	P 5 1:2	P 6 1:2	P 7 1:2	P 8 1:2	P 9 1:2	P 10 1:2	P 11 1:2	P 12 1:2
E	P 1 1:4	P 2 1:4	P 3 1:4	P 4 1:4	P 5 1:4	P 6 1:4	P 7 1:4	P 8 1:4	P 9 1:4	P 10 1:4	P 11 1:4	P 12 1:4
F	P 1 1:8	P 2 1:8	P 3 1:8	P 4 1:8	P 5 1:8	P 6 1:8	P 7 1:8	P 8 1:8	P 9 1:8	P 10 1:8	P 11 1:8	P 12 1:8
G	P 1 1:16	P 2 1:16	P 3 1:16	P 4 1:16	P 5 1:16	P 6 1:16	P 7 1:16	P 8 1:16	P 9 1:16	P 10 1:16	P 11 1:16	P 12 1:16
H	P 1 1:32	P 2 1:32	P 3 1:32	P 4 1:32	P 5 1:32	P 6 1:32	P 7 1:32	P 8 1:32	P 9 1:32	P 10 1:32	P 11 1:32	P 12 1:32

Abbildung 29: Auftragsschema für die Belegung der Multititerplatte.

P 1 – P 12: Proben 1 bis 12; 1:2 – 1:32 : Verdünnungsstufen der jeweiligen Probe mit MSTB-Puffer

- 6) Es folgt ein Waschschrift wie in Nr. 4) beschrieben.
- 7) In jede Vertiefung werden 100 µl der 2. Antikörperlösung gegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert.
- 8) Es folgt ein Waschschrift wie in Nr. 4) beschrieben.
- 9) In jede Vertiefung werden 100 µl TMB-Chromogen-Lösung gegeben und bei RT solange inkubiert, bis auch in der höchsten Standardverdünnung eine Blaufärbung zu erkennen ist. Anschließend wird in jede Vertiefung 150 µl Stop-Lösung gegeben.
- 10) Die Messung und Auswertung erfolgt mit dem ELISA-Reader EL_x 808 Microplate Autoreader (siehe D.1.1) und mit Hilfe der MicroWin V. 3.15 Software (siehe D.1.13). Bestimmt wird die Extinktion als Endpunktmessung bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm. Die HCII-Konzentration in den Proben wird von dem Programm automatisch durch Vergleich mit der Regressionskurve des Standards (4 Parameter Curve-Fit) errechnet.

Einige der Proben enthielten 3 mM DTT (siehe D.2.5.2.1). Nach der Verdünnung mit MSTB-Puffer ergab sich daraus eine DTT-Konzentration von 1,5 mmol/l. Um einen korrekten Vergleich zu den Konzentrationen der Standard-Verdünnungsreihe ziehen zu können, wurde der ELISA so angesetzt, daß sich in allen 96 Vertiefungen der ELISA-Platte 1,5 mM DTT befand.

Der Einfluß der steigenden NaCl-Konzentration in den untersuchten FPLC-Fractionen wurde durch Zugabe von 200 mM bzw. 400 mM NaCl zu Proben aus verdünntem Standard-Humanplasma untersucht. Die erhaltenen Messwerte zeigten nur minimale Abweichungen von den Messwerten der entsprechenden Proben der Standard-Verdünnungsreihe ohne NaCl-Zugabe (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Alkylierung von Cysteinresten mit Iodacetamid hatte nur geringen Einfluß auf die erhaltenen ELISA-Messwerte. Zur Überprüfung dieses Faktors wurde Zellkulturüberstand mit HCIIΔC F195C/P52C parallel reduziert und alkyliert. bzw mit dem selben Volumen Puffer versetzt und anschließend im Elisa die HCII-Konzentration bestimmt. Die erhaltenen Messwerte zeigten nur einen Abweichung von ca. 10 %, was im Rahmen der Messungenauigkeit des Tests liegt (Ergebnisse ebenfalls nicht dargestellt).

D.2.5.2 Affinitätschromatographische Reinigung von HCII

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen matrixgebundenen Bindungspartner. Ein verfügbarer, affiner Bindungspartner wird dabei kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die spezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül wird genutzt, um dieses selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Zielmoleküls wird anschließend durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht. Die Affinitätschromatographie ist die Trennungsmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Reinigung von Biomolekülen.

Alle Chromatographieschritte wurden mit dem FPLC[®]-System (**F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography) der Firma Pharmacia durchgeführt. Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 30 dargestellt. Das System besteht aus den im Abschnitt "Geräte" (siehe D.1.1) aufgeführten Komponenten. Die Äquilibrierung der Säulen und die Elution erfolgte mit Hilfe der FPLC-Director Software V.1.1. (siehe D.1.13), alle anderen Schritte erfolgten durch manuelle Steuerung der Controllerkonsole. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch entgast. Die Abtrennung von Partikeln erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 12000 x g. Darauf folgte die Entgasung der Probe mit der Wasserstrahlpumpe.

Die Affinitätschromatographien wurden mit Heparin-Sepharose wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

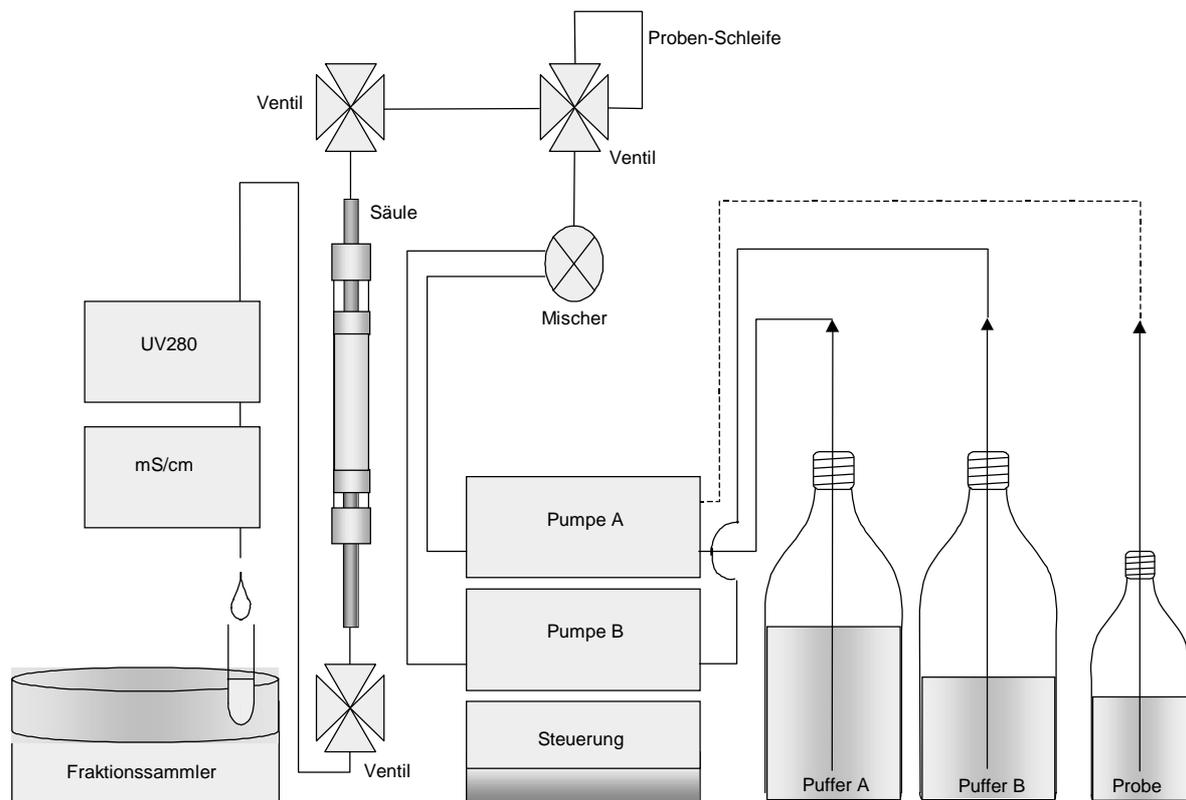


Abbildung 30: Aufbau und Komponenten des FPLC[®]-Systems. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dipl.-Biol. Christoph Böhme zur Verfügung gestellt.

D.2.5.2.1 Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose und linearem NaCl-Gradienten

Für die Aufreinigung von HCII aus Zellkulturüberständen wurde eine HiTrap[®] Heparin-Sepharose-Säule der Firma Pharmacia verwendet. Die Eigenschaften des Säulenmaterials sind in Tabelle 13 aufgeführt. Immobilisiertes Heparin eignet sich neben der Reinigung von HCII auch zur Reinigung zahlreicher Gerinnungsfaktoren¹ (Thrombin, AT, Faktoren IX, X, XI, XII). Bei der Reinigung von HCII durch Heparin-Sepharose macht man sich die Tatsache zu nutze, daß HCII durch einige GAGs wie z.B. Heparin aktiviert wird, für die es eine spezielle Bindungsstelle im Molekül gibt² (siehe auch B.5.2).

Matrix:	quervernetzte Agarose
Heparin:	Heparin aus Schweinedarmmukosa (5- 30 kDa)
gekoppelte Heparinmenge	10 mg/ml Gel
Bindungskapazität	~ 3 mg Antithrombin/ml Gel
Partikelgröße	34 µm
Säulenvolumen (cv)	5 ml

Tabelle 13: Eigenschaften der verwendeten HiTrap[®] Heparin-Sepharose Säule

Lösungen:

- Dialyse-Puffer pH 7,4: 20 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
- Puffer A pH 7,4: 20 mM Tris-HCl
- Puffer A + DTT pH 7,4: 20 mM Tris HCl
3 mM DTT
- Puffer B pH 7,4: 20 mM Tris-HCl
1 M NaCl
- Puffer B + DTT pH 7,4: 20 mM Tris HCl
1 M NaCl
3 mM DTT
- Puffer C pH 7,4: 20 mM Tris-HCl
3 M NaCl
- Säulenlagerungslösung: 20 % (v/v) Ethanol
- PMSF-Lösung (100-fach): 100 mM in Isopropanol

Folgende HCII-Varianten wurden mittels Heparin-Sepharose mit bzw. ohne DTT aufgereinigt:

- Wildtyp-HCII
- HCIIΔC F195C/P52C
- HCIIΔC F195C/G54C
- HCIIΔC F195C/S68C

¹ Farooqui 1980

² Tollefsen *et al.* 1982, Ragg *et al.* 1990 a & b

Die Zellkulturüberstände wurden nach Ende des Transfektionsversuches (siehe D.2.2.7.2) für 5 Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, um tote Zellen und Zellbruchstücke abzutrennen. Anschließend wurde dem Zellkulturüberstand 1/100 Volumen PMSF-Lösung zugesetzt. Alle Zellkulturüberstände wurden vor Beginn der FPLC-Reinigung gegen 5 Liter Dialysepuffer ü.N. bei 4°C dialysiert. Der Dialyseschlauch (MWCO 12-14 kDa) wurde hierfür vor Gebrauch drei mal mit dH₂O ausgekocht.

Die FPLC-Reinigung wurde entweder unter reduzierenden Bedingungen, oder unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bei reduzierenden Bedingungen wurden die Puffer "A+DTT" und "B+DTT" statt der Puffer "A" und "B" verwendet. Dem Zellkulturüberstand wurde bei reduzierenden Bedingungen nach dem Entgasen der Proben und vor dem Auftrag auf die Säule DTT zu einer Endkonzentration von 3 mmol/l zugesetzt.

Die Elution von der Säule erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 20 Fraktionen à 2 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min.

Der Ablauf der HCII-Reinigung über Heparin Sepharose ist nachfolgend dargestellt:

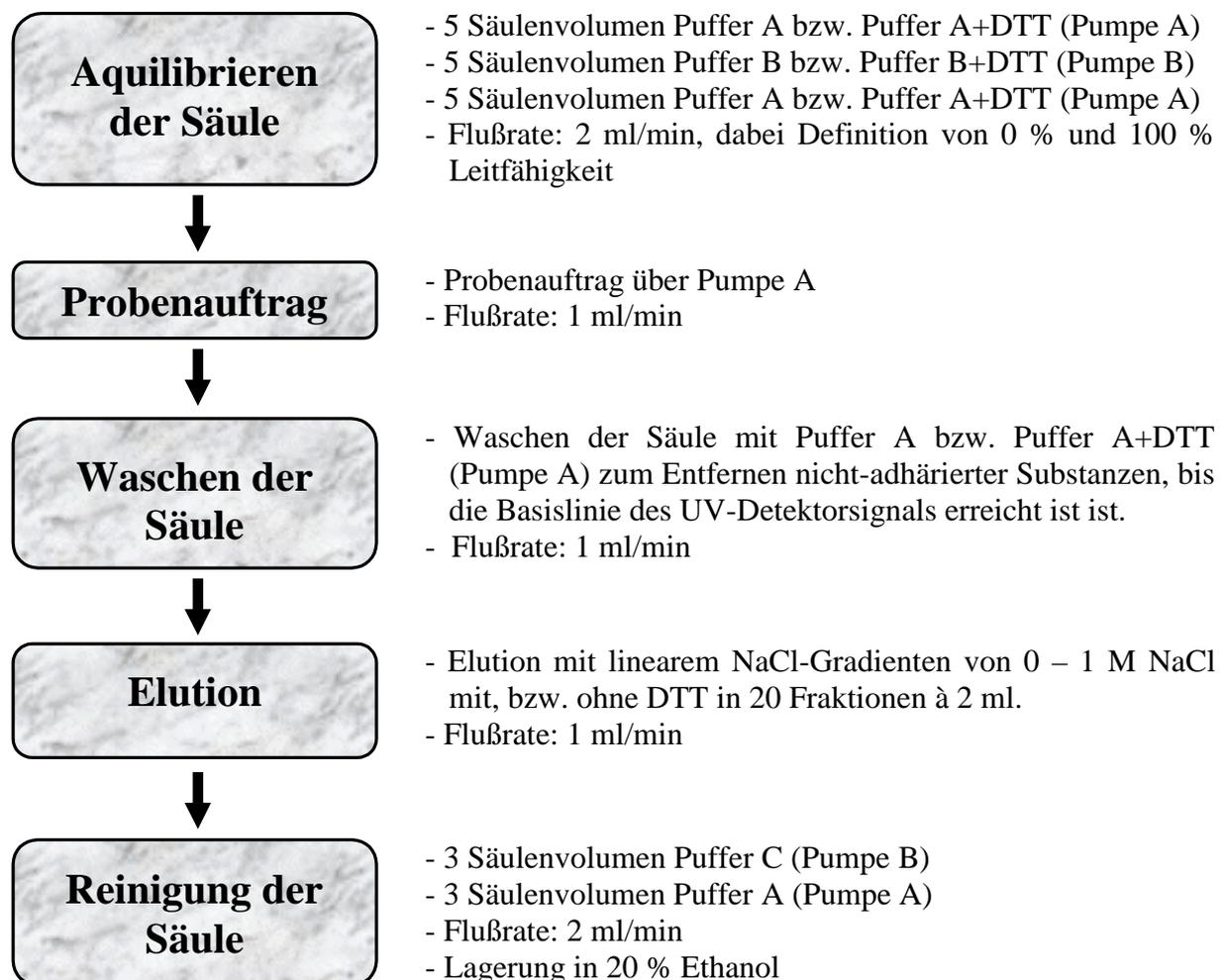


Abbildung 31: Ablauf der HCII-Reinigung mit Heparin-Sepharose

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels ELISA (siehe D.2.5.1) auf ihren HCII-Gehalt getestet. Die drei Fraktionen mit den höchsten HCII-Konzentrationen wurden gepoolt und ggf. mit Hilfe von Mikrokonzentratoren konzentriert und umgepuffert (siehe D.2.5.3). Das Laufverhalten der isolierten HCII-Varianten wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe D.2.5.9) untersucht und die biologische Aktivität von HCIIΔC F195C/P52C nach Dialyse gegen Komplexierungspuffer pH 8,0 durch Komplexierung mit Thrombin getestet (siehe D.2.5.8).

D.2.5.2.2 Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose und NaCl-Stufengradienten

Zellkulturüberstände aus stabil transfizierten CHO DUKX B1-Zellen (siehe D.2.2.8.1) wurden mittels eines NaCl-Stufengradienten mit einer HiTrap[®]-Heparin-Sepharose-Säule partiell aufgereinigt. Sofern die Zellkulturüberstände vor dem Auftrag auf die Säule reduziert und alkyliert wurden, erfolgte dies wie unter Abschnitt D.2.5.5 beschrieben. Die Entfernung von überschüssigem Iodacetamid erfolgte durch Dialyse gegen Dialyse-Puffer. Alle Proben wurden für mindestens sechs Stunden dialysiert.

Lösungen:

- Dialyse-Puffer pH 7,4:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
- Puffer A pH 7,4:	10 mM Tris-HCl
- Puffer B pH 7,4:	10 mM Tris-HCl 1 M NaCl
- Puffer C pH 7,4:	20 mM Tris-HCl 3 M NaCl
- Säulenlagerungslösung:	20 % (v/v) Ethanol
- PMSF-Lösung (100-fach):	100 mM in Isopropanol

Der Ablauf der Aufreinigung entspricht dem im Abschnitt D.2.5.2.1 dargestellten Ablauf. Der Probenauftrag erfolgt jedoch mit einer maximalen Flußrate von 0,7 ml/min und die Elution erfolgte mit nachfolgendem Stufengradienten:

- Flußrate: 1 ml/min
- Fraktionsgröße: 2ml
- 10 ml 0% Puffer B; entspricht 0 mM NaCl
- 10 ml 10% Puffer B; entspricht 100 mM NaCl
- 15 ml 30% Puffer B; entspricht 300 mM NaCl
- 10 ml 100% Puffer B; entspricht 1000 mM NaCl

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels ELISA (siehe D.2.5.1) auf ihren HCII-Gehalt getestet. Die HCII-Fraktionen mit der höchsten HCII-Konzentration der 300 mM NaCl-Stufe wurden für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung (siehe D.2.5.14) verwendet. Das Laufverhalten der isolierten HCII-Varianten wurde zudem unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe D.2.5.9) untersucht.

Folgende HCII-Varianten wurden mittels NaCl-Stufengradient partiell aufgereinigt:

- Wildtyp-HCII aus CHO DUKX B1 Zellen
- Wildtyp-HCII aus CHO DUKX B1 Zellen reduziert und alkyliert
- HCIIΔC F195C/P52C aus CHO DUKX B1 Zellen
- HCIIΔC F195C/P52C aus CHO DUKX B1 Zellen reduziert und alkyliert

D.2.5.3 HCII-Konzentrierung und Umpufferung mit Mikrokonzentratoren

Die Konzentrierung von HCII-Lösungen erfolgte mit Hilfe der Microsept™ Mikrokonzentratoren (siehe D.1.12) mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 30 kDa.

Bis zu 3,5 ml Probenlösung werden in die obere Kammer eingefüllt und bei 3000 – 7500 x g zentrifugiert. Proteine mit einer Proteingröße über 30 kDa werden dabei durch die Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten, während das Filtrat und Proteine < 30 kDa die Membran passieren. Zur gleichzeitigen Umpufferung und Konzentrierung von Proben werden 3,5 ml Probe bis zu einem Volumen von ca. 100 µl konzentriert und die Probe anschließend mit 3,4 ml des gewünschten Puffers aufgefüllt. Die Probe wird erneut bis auf ca. 100 µl konzentriert und ggf. mit bis zu 400 µl Puffer verdünnt.

D.2.5.4 Bromcyanspaltung von HCII

Die Umsetzung eines Proteins mit Bromcyan verwandelt die Methioninreste in Homoserinreste und spaltet die Aminosäurekette auf der carboxyterminalen Seite des Methioninrestes¹. Die Spaltung ist mit 90-95 % nahezu vollständig und Methionin-spezifisch. Probleme können bei Met-Ser- und Met-Thr- Bindungen auftreten, wo die Hydroxylgruppen von Serin und Threonin die Ringöffnung des intermediären Iminoringes stören können. Die Reaktion wird meistens in 70 % Ameisensäure unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, wodurch es im Anschluß an die Spaltung möglich ist, die flüchtigen Reagenzien abzdampfen.

Der Nachteil der Methode liegt in der hohen Toxizität von Bromcyan und der Gefahr von Blausäurefreisetzung. Daher wurden alle Arbeitsschritte nur unter dem Abzug unter strengen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt².

Abbildung 32 zeigt den Reaktionsmechanismus der Bromcyanspaltung

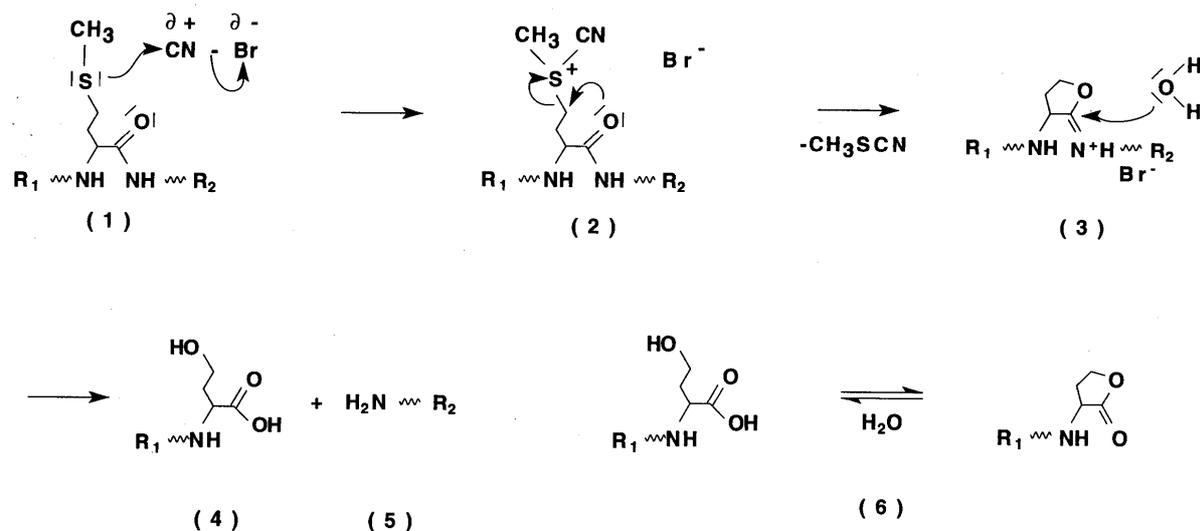


Abbildung 32: Reaktionsmechanismus der Bromcyanspaltung (aus: Kellner, R.; Lottspeich, F.; Meyer, H.E.: Microcharacterisation of proteins)

¹ Gross & Witkop 1961, Morrison *et al.* 1990

² Merkblatt Cyanwasserstoff, Blausäure, Cyanide der BG Chemie

Sezerniertes HCII enthält 18 Methionine in den Aminosäurepositionen 33, 143, 145, 248, 268, 269, 288, 306, 307, 336, 344, 347, 366, 393, 397, 405, 442 und 471. Die theoretischen Massen der entstehenden Peptidfragmente wurde mit Hilfe der PeptideMass Software (siehe D.1.14) errechnet und sind im Abschnitt E.7.2 dargestellt.

Ausgangsmaterial für die Bromcyanspaltungen waren Zellkulturüberstände aus der Elektroporation von COS7-Zellen (siehe D.2.2.7.2), welche über Heparin-Sepharose partiell aufgereinigt wurden (siehe D.2.5.2.1) und mit Hilfe von Microsept™ Mikrokonzentratoren in 20 mM Tris-HCl pH 7,4 umgepuffert und konzentriert wurden (siehe D.2.5.3).

Folgende rekombinante HCII-Proteinvarianten wurden mit Bromcyan gespalten:

- Wildtyp-HCII
- HCII Δ C F195C/P52C
- HCII Δ C F195C/G54C
- HCII Δ C F195C/S68C

Alle Arbeitsschritte der Bromcyanspaltung¹ wurden unter dem Abzug durchgeführt.

Ca. 0,2 μ g HCII in 50 μ l 20 mM Tris-HCl pH 7,4 wurden in der Vakuum-Zentrifuge für 5 Minuten entgast und mit 124,8 μ l 99 %-iger Ameisensäure, welche zuvor 15 Minuten mit N₂ begast wurde, gemischt. Zu der Lösung wurde ein Korn Bromcyan (Kantenlänge ca. 1-1,5 mm) gegeben, die Probe mit N₂ überschichtet, dicht versiegelt und das Bromcyan anschließend unter vorsichtigem Schütteln gelöst. Die Spaltung erfolgte 24 – 60 Stunden bei RT unter Lichtabschluß. Anschließend wurde der Ansatz zwei mal mit je fünf Volumen entgastem dH₂O verdünnt und im Exsikkator unter Vakuum eingedampft. Das dadurch entstehende Pellet wurde in 20 μ l 2-fach konzentriertem nicht-reduzierendem Probenpuffer (siehe D.2.5.9) resuspendiert und in zwei gleich große Aliquots aufgeteilt. Eines der beiden Aliquots wurde mit 2-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 5 % (v/v) versetzt. Die beiden Proben, von denen eine reduzierenden Probenpuffer, die andere nicht-reduzierenden Probenpuffer enthielt, wurden nebeneinander in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 14% Novex Fertiggel (siehe D.2.5.9) aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert und verglichen.

D.2.5.5 Alkylierung von HCII

Um die Auswirkung der neu in das HCII-Molekül eingefügten Disulfidbrücke auf die Aktivierung durch GAGs untersuchen zu können, wurden Vergleiche zwischen dem Verhalten von HCII mit geschlossener Disulfidbrücke und mit geöffneter reduzierter und alkylierter Disulfidbrücke durchgeführt.

Die Reduktion von Disulfidbrücken erfolgte mit Dithiothreitol (DTT, Cleland Reagenz), welches Disulfidbrücken quantitativ reduziert. Die Reduktion wird dabei unter basischen Bedingungen durchgeführt, da für die Reaktion Thiolatanionen (R-S⁻) vorliegen müssen². Obwohl die Literatur hierfür einen pH-Wert von > 8,5 empfiehlt³, gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, in denen die Reduktion von Disulfidbrücken bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt wird⁴, vermutlich um Proteinschädigungen durch Deaminierung⁵ zu vermeiden.

¹ Keller *et al.* 1994

² Lamoureux & Whitesides 1993

³ Darby & Creighton 1997

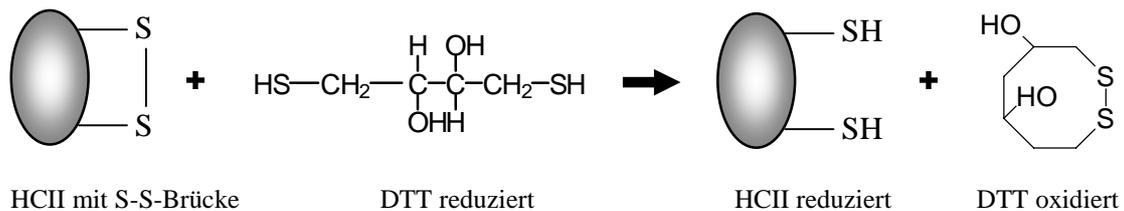
⁴ Church *et al.* 1987, Tan *et al.* 1996, Wen *et al.* 1996

⁵ Lundell & Scheitmüller 1999

Um eine Re-Oxidation von reduzierten Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die freien Thiolgruppen mit Iodacetamid alkyliert, welches freie Thiole quantitativ und irreversibel zu S-Carboxamidomethylcystein umwandelt¹. Für HCII wurde bereits gezeigt, daß eine Alkylierung der drei natürlich vorkommenden Cysteine mit Iodacetamid keinen Einfluß auf die biologische Aktivität hat².

Das Prinzip der HCII-Alkylierung mit Iodacetamid ist in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

A: Reduktion von Disulfidbrücken mit DTT



B: Alkylierung von Cysteinresten mit Iodacetamid

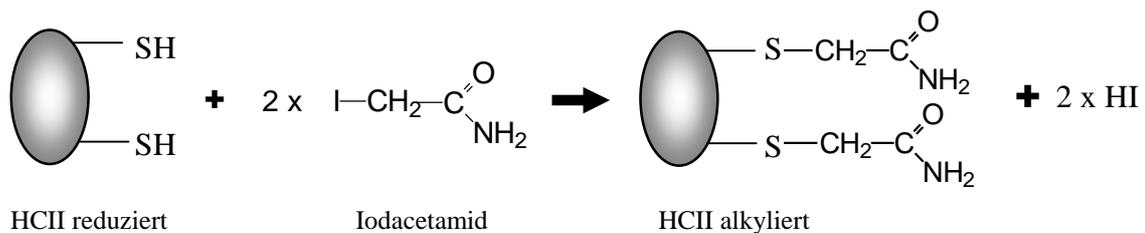


Abbildung 33: Reduktion und Alkylierung von HCII mit DTT und Iodacetamid

Lösungen:

- Zellkulturüberstände aus COS7-Elektroporationen (siehe D.2.2.7.2)
- 100 mM DTT in 0,5 M Tris-HCl pH 8,0
- 150 mM Iodoacetamid in 0,5 M Tris-HCl pH 8,0
- 1 x Komplexierungspuffer pH 7,4: 20 mM Tris HCl
 150 mM NaCl
- 10 % PEG 8000 in dH₂O

Ausgangsmaterial für die Alkylierung von HCII waren Zellkulturüberstände aus der Transfektion von COS7-Zellen (siehe D.2.2.7.2). Der pH-Wert der Zellkulturüberstände betrug außerhalb des Begasungsbrutschranke 7,95 bis 8,0, so daß keine pH-Wert-Einstellung vorgenommen werden mußte. Zu den Zellkulturüberständen wurde 1/20 Volumen 100 mM DTT in 0,5 M Tris-HCl pH 8,0 gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Alkylierung erfolgte mit einem dreifachen Überschuß von Iodoacetamid gegenüber DTT.

¹ Darby & Creighton 1997

² Church *et al.* 1987

Hierfür wurde 1/10 Volumen 150 mM Iodacetamid in 0,5 M Tris-HCl pH 8,0 zum Reaktionsansatz gegeben und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Entfernung von überschüssigem Iodacetamid und die Umpufferung der alkylierten Zellkulturüberstände erfolgte mit Microsept™ Mikrokonzentratoren (siehe D.2.5.3). Die Proben wurden auf ca. 100 µl eingeeengt, einmal mit 3,4 ml Komplexierungspuffer (siehe D.2.5.8) verdünnt und erneut auf ca. 100 µl konzentriert. Der Verdünnungs- und Konzentrierungsschritt wurde ein zweites mal wiederholt und anschließend mit Komplexierungspuffer auf 495 µl aufgefüllt und 5 µl 10% PEG8000-Lösung zugegeben. PEG soll ein Adhären der Proteine an die Gefäßwände von Reaktionsgefäßen verhindern. Die Proben wurden in Aliquots à 50 µl bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen kein zweites Mal eingefroren, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß HCII in Komplexierungspuffer gelöst bei mehrfachem Auftauen anscheinend ausfällt (Ergebnisse nicht dargestellt). Um gleichwertiges nicht-alkyliertes HCII für die Vergleichsstudien zu erhalten, wurden Aliquots der verwendeten Zellkulturüberstände der gleichen Prozedur unterworfen, allerdings ohne DTT- und Iodacetamidzugabe.

Als Kontrollen wurden Zellkulturüberstände nur mit Iodacetamid behandelt, oder DTT und Iodacetamid wurden vor Zugabe zum Zellkulturüberstand gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Die HCII-Konzentration der erhaltenen Proben wurde im Western-Blot quantitativ durch Vergleich mit bekannten Mengen an Standard-Humanplasma bestimmt (siehe D.2.5.12).

Zellkulturüberstände mit folgenden rekombinanten HCII-Varianten wurden alkyliert:

- Wildtyp-HCII
- HCII F195C
- HCIIΔC
- HCIIΔC F195C
- HCIIΔC F195C/P52C

D.2.5.6 Bestimmung der DTT-Grenzkonzentration zur Reduktion der neu eingeführten Disulfidbrücke

Zur Ermittlung der minimal benötigten DTT-Konzentration zur Reduktion der neu eingeführten Disulfidbrücke in HCIIΔC F195C/P52C wurde konzentrierter und in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 (siehe D.2.5.8) umgepufferter Zellkulturüberstand (siehe D.2.5.3) aus der Lipofektion von COS7-Zellen (siehe D.2.2.7.1) verwendet. Die Proben wurden 3 Minuten in der Vakuum-Zentrifuge entgast, und mit DTT (gelöst in N₂-begastem 1x Komplexierungspuffer pH 8,0) auf DTT-Konzentrationen von 1 µM bis 1 mM eingestellt. Anschließend wurden sie mit N₂ überschichtet, für 20 Minuten bei 25°C inkubiert und danach ein Volumen 2-fach konzentrierter nicht-reduzierender Probenpuffer (siehe D.2.5.9) zugegeben. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot (siehe D.2.5.10). Als Kontrolle wurde Zellkulturüberstand aus mit Wildtyp-HCII transfizierten Zellen der gleichen Behandlung unterzogen.

D.2.5.7 Reoxidation von reduziertem HCII

Die Entstehung einer neuen Disulfidbrücke zwischen den zwei neu ins Molekül eingeführten Cysteinen kann aus theoretischer Sicht auch dadurch begründet sein, daß das Molekül bei der Faltung im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) in eine unphysiologische Konformation gezwängt wurde. Das entstehende Disulfidbrücken-verknüpfte Molekül wäre dann inaktiv, und damit nicht in der Lage Thrombin zu inhibieren. Die Reduktion der Disulfidbrücke mit DTT könnte dem Molekül die Möglichkeit geben, sich wieder in seine korrekte Konformation zu falten, die dann wieder inhibitorisch aktiv wäre. Dieses Szenario würde zwangsläufig zu einer Fehlinterpretation über den postulierten allosterischen Aktivierungsmechanismus von HCII führen.

Der Nachweis von biologischer Aktivität der reduzierten Form von HCII und die Reoxidation der reduzierten Disulfidbrücke zwischen den beiden einzigen Cysteinresten in Molekül würde zeigen, daß die beiden Bereiche, in welchen die neu eingeführten Cysteine enthalten sind (saurer N-Terminus und carboxyterminales Ende von Helix D), auch *in vivo* im aktiven HCII bei Abwesenheit von GAGs in räumlicher Nähe zueinander stehen, oder sich zumindest nahe kommen.

Als anorganisches Oxidationsmittel wurde Kupfer-(II)-phenanthrolin¹ verwendet, als "biologisches" Oxidationsmitteln oxidiertes Glutathion².

Lösungen:

- serumfreie Zellkulturüberstände aus stabil mit psbr21 transfizierten CHO DUKX B1-Zellen (siehe D.2.2.8.1)
- Reoxidationspuffer pH8,0: 0,5 M Tris-HCl
- Dialysepuffer pH 8,0: 50 mM Tris HCl
150 mM NaCl
- 500 µM Dichloro(1,10-Phenanthrolin)Kupfer(II) ,(Kupfer-(II)-Phenanthrolin) in Reoxidationspuffer
- 100 mM oxidiertes Glutathion (GSSG) in Reoxidationspuffer
- nicht-reduzierender Probenpuffer (siehe D.2.5.9)

HCIIΔC F195C/P52C-haltige serumfreie Zellkulturüberstände wurden, sofern nötig, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt, für 30 Minuten mit 2 mM DTT bei 37°C reduziert und anschließend zwei mal drei Stunden gegen Dialysepuffer dialysiert.

Die Reoxidation erfolgte mit Endkonzentrationen von 50 µM Kupfer-(II)-Phenanthrolin, bzw. mit 2 mM oxidiertem Glutathion über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Proben mit einem Volumen nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt und drei Minuten bei 94°C erhitzt. Die Auswertung erfolgte mittels Western-Blot (siehe D.2.5.10).

¹ Zeng *et al.* 1999

² Wen *et al.* 1996

D.2.5.8 HCII/Thrombin-Komplexierungen

HCII bildet mit Thrombin SDS-stabile Komplexe¹ im Verhältnis 1:1. Die Komplexierung erfolgt in Gegenwart von GAGs wie Heparin oder Dermatansulfat um ca. drei Größenordnungen schneller² als in deren Abwesenheit. (Für eine detailliertere Beschreibung der Komplexierung zwischen HCII und Thrombin siehe B.5.2)

Lösungen:

- 1 x Komplexierungspuffer pH 7,4 oder pH 8,0: 20 mM Tris HCl
150 mM NaCl
- 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 + 0,1 % (w/v) PEG 8000
- Thrombin aus Humanplasma: 306 NIH units (2910 NIH units/mg Protein)
gelöst in 1 ml 20 mM Bis/Tris Puffer pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,1 % PEG 8000
anschließend 1:50 verdünnt in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 + 0,1 %
PEG 8000 entspr. 59,2 fmol/µl
- Standard-Humanplasma (90 µg/ml HCII) 1:100 verd. in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0
- Heparin-Lösung: 125 Units/ml (D.2.5.8.1) oder 250 Units/ml (D.2.5.8.2) in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0
- Dermatansulfat-Lösung: 5 mg/ml (D.2.5.8.1) oder 25 mg/ml (D.2.5.8.2) in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0
- 2-fach konz. reduzierender Probenpuffer: siehe D.2.5.9
- DTT-Lösung: 25 mM in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0

D.2.5.8.1 HCII/Thrombin-Komplexierung mit bzw. ohne DTT-Zugabe

Um die Auswirkung der neu in das HCII-Molekül eingefügten Disulfidbrücke auf die Aktivierung durch GAGs untersuchen zu können, wurden HCII-haltige Proben in der Gegenwart, oder Abwesenheit von 1 mM DTT mit Heparin oder Dermatansulfat mit Thrombin komplexiert. Als Proben wurden Zellkulturüberstände aus der Lipofektion von COS7-Zellen verwendet (siehe D.2.2.7.1), die mit Microsept™ Mikrokonzentratoren konzentriert und in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 umgepuffert waren (siehe D.2.5.3). Die HCII-Konzentration der konzentrierten und umgepufferten Proben wurde mittels quantitativem Western-Blot (siehe D.2.5.12) bestimmt und die Konzentration der Proben an die niedrigste gemessenen Konzentration (1,24 µg/ml = 18,9 fmol/µl) der sechs untersuchten Proben durch Verdünnung mit 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 angepasst. Als Kontrolle wurde 1:100 in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 verdünntes Standard-Humanplasma verwendet.

Jede Probe wurde in vier parallelen Ansätzen unter den nachfolgend angegebenen Reaktionsbedingungen mit Thrombin komplexiert, wobei das molare Verhältnis von HCII zu Thrombin jeweils 2:1 war.

¹ Tollefsen & Blank 1981

² Tollefsen *et al.* 1983

- a) 1 mM DTT + 10 U/ml Heparin → 5 Minuten Inkubation bei 25 °C → Zugabe von Thrombin → 20 Minuten Inkubation bei 25 °C
- b) ohne DTT + 10 U/ml Heparin → 5 Minuten Inkubation bei 25 °C → Zugabe von Thrombin → 20 Minuten Inkubation bei 25 °C
- c) 1 mM DTT + 300 µg/ml Dermatansulfat → 5 Minuten Inkubation bei 25 °C → Zugabe von Thrombin → 20 Minuten Inkubation bei 25 °C
- d) ohne DTT + 300 µg/ml Dermatansulfat → 5 Minuten Inkubation bei 25 °C → Zugabe von Thrombin → 20 Minuten Inkubation bei 25 °C

Die Proben wurden vor Versuchsbeginn 3 Minuten in der Vakuumzentrifuge entgast und für die beiden nachfolgenden Schritte jeweils mit N₂ überschichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen an 2-fach konz. reduzierenden Probenpuffer gestoppt und die Proben mittels Western-Blot (siehe D.2.5.10) analysiert.

Zellkulturüberstände mit folgenden rekombinanten HCII-Varianten wurden komplexiert:

- Wildtyp-HCII
- HCIIΔC
- HCIIΔC F195C
- HCIIΔC F195C/P52C
- HCIIΔC F195C/G54C
- HCIIΔC F195C/S68C

D.2.5.8.2 Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid

Um Informationen über die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener HCII-Varianten bei der Komplexbildung mit Thrombin in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von GAGs zu erhalten, wurden Proben mit Thrombin komplexiert und nach definierten Zeitpunkten Aliquots der Reaktionsansätze entnommen. Als Probenmaterial wurden alkylierte bzw. nicht-alkylierte Zellkulturüberstände (siehe D.2.5.5) aus der Lipofektion von COS7-Zellen (siehe D.2.2.7.1) verwendet, deren HCII-Konzentration mittels quantitativem Western-Blot bestimmt wurde (siehe D.2.5.12). Die Konzentration der Proben wurde an die niedrigste gemessene Konzentration (0,68 µg/ml = 10,4 fmol/µl) durch Verdünnung mit 1x Komplexbildungspuffer pH 8,0 + 0,1 % (w/v) PEG 8000 angepasst.

Zellkulturüberstände mit folgenden rekombinanten HCII-Varianten (alkyliert bzw. nicht-alkyliert) wurden in der Anwesenheit oder Abwesenheit von GAGs mit Thrombin komplexiert:

- Wildtyp-HCII
- HCII F195C (nur in Anwesenheit von GAGs)
- HCIIΔC
- HCIIΔC F195C
- HCIIΔC F195C/P52C

D.2.5.8.2.1 Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Anwesenheit von GAGs

Jede Probe wurde in zwei parallelen Ansätzen bei 25°C mit Thrombin komplexiert, wobei das molare Verhältnis von HCII zu Thrombin jeweils 2:1 war.

- a) + 10 U/ml Heparin (=57 µg/ml)→ 3 Minuten Inkubation bei 25°C→ Zugabe von Thrombin
- b) + 1 mg/ml Dermatansulfat→ 3 Minuten Inkubation bei 25°C→ Zugabe von Thrombin

Aliquots der Reaktionsansätze wurden jeweils 0, 15, 30, 75 und 180 Sekunden nach Thrombin-Zugabe entnommen und zum Stoppen der Reaktion mit einem Volumen 2-fach konzentriertem reduzierendem Probenpuffer gemischt, wobei die 0-Sekundenprobe bei allen beschriebenen Komplexierungen vor Zugabe von Thrombin entnommen wurde. Die Proben wurden mittels Western-Blot (siehe D.2.5.10) ausgewertet. Die ECL[®]-Hyperfilme wurden bei der Belichtung jeweils 60, 90 bzw. 120 Sekunden auf die Western-Blot Membran gelegt, um vergleichbare Bedingungen für die Auswertung zu gewährleisten. Für die Ermittlung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden die entwickelten ECL[®]-Hyperfilme mit der CCD-Videokamera auf dem Transilluminator mit GloScreen™ UV Conversion Screen und der PhotoFinish ZSoft V3.0 Software (siehe D.1.13) digital dokumentiert. Mit Hilfe der WinCam V2.2 Software (siehe D.1.13) wurde densitometrisch das prozentuale Verhältnis von HCII/Thrombin-Komplexen zu nicht komplexiertem HCII bestimmt. Der entstandene prozentuale Anteil an HCII/Thrombin-Komplexen je Zeiteinheit ist dabei ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen HCII-Varianten mit Thrombin.

In einem weiteren Versuch wurde nicht-reduziertes HCIIAC F195C/P52C bei 25°C mit 10 U/ml Heparin oder 1 mg/ml Dermatansulfat mit Thrombin (molares Verhältnis HCII/Thrombin 2:1) für 0, 30, 60, 120 bzw. 180 Minuten inkubiert, die entnommenen Proben mit einem Volumen an 2-fach konzentriertem Probenpuffer gemischt und im Western-Blot ausgewertet. Die Belichtung des ECL[®]-Hyperfilms erfolgte für 20 Minuten.

D.2.5.8.2.2 Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Abwesenheit von GAGs

Die Proben wurden in Abwesenheit von GAGs bei 25°C mit Thrombin bei einem molaren Verhältnis von Inhibitor zu Thrombin von 2:1 inkubiert, und Aliquots nach jeweils 0, 30, 60, 120, und 180 Minuten entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen an 2-fach-konzentriertem reduzierendem Probenpuffer gestoppt, und die Proben anschließend mittels Western-Blot ausgewertet. Die Belichtung des ECL[®]-Hyperfilms erfolgte bis zu 20 Minuten lang.

Sowohl für die reduzierte und alkylierte, als auch für die unbehandelte Form von HCIIAC F195C/P52C wurde der Versuch bei gleicher HCII-Konzentration wie im obigen Versuch, aber mit einem molaren Verhältnis von Inhibitor zu Thrombin von 1:2 wiederholt. Der ECL[®]-Hyperfilm wurde anschließend für 35 Minuten belichtet.

Eine densitometrische Auswertung der ECL[®]-Hyperfilme machte bei den beschriebenen langen Belichtungen keinen Sinn, da die Bande mit unkomplexiertem HCII sehr stark überbelichtet werden mußte, um die HCII/Thrombin-Komplex-Bande sichtbar zu machen.

D.2.5.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**¹ (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einer Polyacrylamid-Matrix. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. SDS lagert sich an das Protein an, entfaltet das Protein und zerstört dabei fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Aufgrund eines konstanten Massenverhältnisses von 1,4 g SDS je Gramm Protein² (ca. 1 SDS-Molekül je 2 Aminosäuren³), entsteht ein konstantes Verhältnis zwischen der Zahl der Ladungen und der Größe des Proteins, wobei die Eigenladung des Proteins überdeckt wird. Die entstehenden negativ geladenen ellipsoiden Mischmizellen werden bei der Wanderung zur Anode durch den Siebeffekt der Gelmatrix aufgrund ihrer Größe (Stokes Radius) aufgetrennt, wobei sich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Wanderungsstrecke der SDS-Polypeptid-Mizellen ergibt. Glykoproteine werden im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht weniger stark beladen als nicht-glykosylierte Proteine und wandern daher in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese langsamer als nicht-glykosylierte Proteine gleicher Größe. Proteine mit Disulfidbrücken, werden, sofern die Disulfidbrücken nicht durch ein reduzierendes Agens wie 2-Mercaptoethanol reduziert werden, durch SDS weniger stark entfaltet als Proteine ohne Disulfidbrücken. Dies resultiert in einem kleineren Stokeschen Radius, wodurch Proteine mit Disulfidbrücken schneller durch das Gel wandern, als gleich große Proteine ohne Disulfidbrücken.

Die Gelmatrix für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsteht durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Porengröße wird dabei durch die Totalacrylamid-Konzentration (T) und den Vernetzungsgrad (C) definiert.

Alle SDS-PAGEs wurden mit 1 mm dicken Tris-Glycin-Fertiggelen der Firma Novex und der dazu gehörenden Elektrophorese-Apparatur Xcell II Mini-Cell durchgeführt. Bei den Fertiggelen handelte es sich diskontinuierliche Gele⁴ (DISK-Gele) mit einem Bis-Acrylamid-Anteil (C) von 2,6%, bestehend aus einem weitporigeren 4%-igen Sammelgel (T), und engporigeren 6%, 10% bzw. 14%-igen Trenngelen (T).

Lösungen:

-Laufpuffer (pH 8,3):	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH-Wert <u>nicht</u> einstellen
-nicht-reduzierender Probenpuffer (2-fach konz.):	125 mM TrisHCl pH 6,8 4 % (w/v) SDS 0,005 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin
-reduzierender Probenpuffer (2-fach konz.):	nicht-reduzierender Probenpuffer + 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

¹ Weber & Osborn 1969, Laemmli 1970

² Lottspeich & Zorbas 1998

³ Stryer 1996

⁴ Neville 1971

Die Proben wurden 1:2 mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer verdünnt, drei Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Größenbestimmung der aufgetragenen Proteine wurden Proteingrößenmarker (siehe D.1.6) verwendet, die ebenso wie die Proben behandelt wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 150 V entsprechend den Angaben des Herstellers¹ mit den nachfolgenden Parametern:

Versuch	Tenngel	Laufdauer
- Test auf Dimerbildung (E.8)	6 %	80 min
- Laufverhalten mit bzw. ohne Disulfidbrücke (E.7.1)	10 %	135 min
- HC2IIC F195C/P52C Komplexierungen ohne GAGs bei einem HCII/Thrombin-Verhältnis von 1:2 (D.2.5.8.2.2)		
- Komplexierung mit bzw. ohne DTT-Zugabe (D.2.5.8.1)	10 %	120 min
- Bestimmung der DTT-Grenzkonzentration (D.2.5.6)		
- Reoxidation von reduziertem HCII (D.2.5.7)		
- Bromcyanspaltung von HCII (D.2.5.4)	14 %	90 min
- alle anderen Versuche	10 %	90 min

Tabelle 14: Verwendete Gele und Laufbedingungen bei der SDS-PAGE

D.2.5.10 Western-Blot

Beim Western-Blotting² werden in einem Gel aufgetrennte Proteine durch Kapillartransfer oder Elektrotransfer auf einen Träger für die nachfolgende immunologische Detektion transferiert und immobilisiert. Der gesamte Vorgang aus SDS-PAGE, Western-Blot und Detektion wird oft (z. T. auch in dieser Arbeit) als Western-Blot bezeichnet. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Elektroblothing auf eine hydrophobe inerte Hybond-P PVDF-Membran (**P**oly**v**inylid**e**n**d**ifluorid) übertragen. Die Proteine wandern beim Elektroblothing aufgrund des gebundenen SDS zur Anode, verlieren jedoch dabei, da der Transferpuffer SDS-frei ist, gebundenes SDS, so daß sie über hydrophobe Wechselwirkungen an die hydrophobe Membran binden können. Die geblottete Membran ("blot" = Abklatsch) stellt damit ein Abbild des Geles dar, auf der die aufgetrennten Proteine für die nachfolgenden Immundetektion immobilisiert sind.

Lösungen:

Transferpuffer (pH-Wert nicht einstellen): 12 mM Tris
96 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol hydrophilisiert und anschließend für 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde entsprechend der Angaben des Herstellers³ zusammen mit der äquilibrierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen zwei Blottpapiere und zwei Blotting Pads so in die Transferkammer (Xcell II Blot Module) eingesetzt, daß die Proteine beim nachfolgenden Elektrotransfer aus dem Gel Richtung Anode auf die Membran wanderten. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer befüllt und bei 25 V geblottet. Die Transferzeit betrug unter diesen Bedingungen 1,5 Stunden für HCII bzw. 2,0 Stunden für HCII-Thrombin-Komplexe.

¹ Novex Manual 1997

² Towbin *et al.* 1979

³ Novex Manual 1995

D.2.5.11 Chemilumineszenz-Immundetektion

Die Immundetektion der geblotteten Proteine erfolgt wie in Abbildung 34 dargestellt mit Hilfe zweier Antikörper und dem ECL™-Western-Blotting Detektionsreagenz der Firma Amersham Pharmacia Biotech (siehe D.1.12). Primärantikörper war dabei ein polyklonales Anti-HCII-IgG-Antiserum aus Kaninchen, welches sowohl HCII, als auch Komplexe aus HCII und Thrombin erkennt. (für Antikörper siehe D.1.11) Der Sekundärantikörper war ein polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Esel, welcher mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-phtalazidion) durch H_2O_2 zu 5-Aminophtalsäure unter Abgabe von Licht. Dauer und Intensität der Chemilumineszenz können durch die Zugabe von Enhancern wie z.B. Phenolen deutlich gesteigert werden¹ (ECL = enhanced chemiluminescence). Das Emissionsmaximum des ECL-Systems liegt bei 428 nm und kann mit Blaulicht-empfindlichen Autoradiographiefilmen detektiert werden.

Die Entwicklung der verwendeten ECL®-Hyperfilme erfolgte mit Entwickler D19 und Fixierer UNIFIX entsprechend den Angaben des Herstellers.

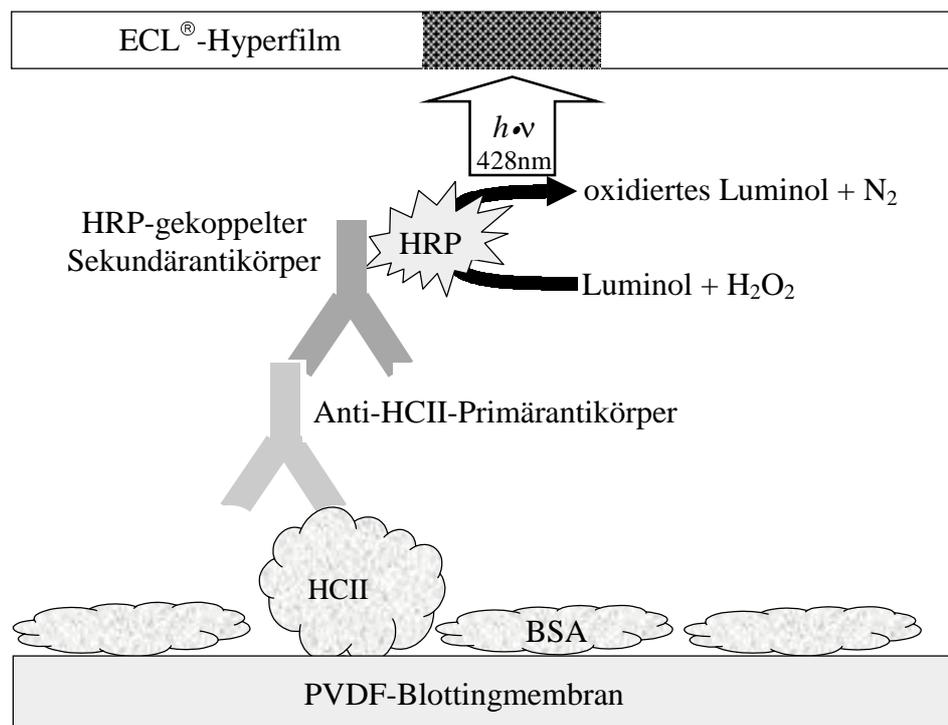


Abbildung 34: Schema der Chemilumineszenz-Immundetektion von HCII und HCII/Thrombin-Komplexen

¹ Amersham-Pharmacia Manual 1998

Lösungen:

- Waschpuffer: PBS-Puffer (siehe D.2.2.1)
+ 0,3 % (v/v) Tween 20
+ 0,3 % (w/v) BSA
- Blockierungslösung: PBS-Puffer (siehe D.2.2.1)
+ 0,3 % (v/v) Tween 20
+ 3,0 % (w/v) BSA
- Antikörperpuffer: PBS-Puffer (siehe D.2.2.1)
+ 0,3 % (v/v) Tween 20
+ 1,0 % (w/v) BSA
- Primärantikörper-Lösung: 20 µl polyklonales anti-human-HCII Antiserum Kan1 1:10 verd. in PBS (siehe D.1.11) in 40 ml Antikörperpuffer
- Sekundärantikörper-Lösung: 10 µl Anti-Kaninchen-Peroxidase gekoppelter IgG aus Esel (siehe D.1.11) in 20 ml Antikörperpuffer
- ECL-Detektionslösung: je 2,5 ml Lösung 1 und 2
- Entwickler D19
- Fixierer Unifix

Alle Schritte der Chemilumineszenz-Immundetektion fanden bei RT auf einem Schwenkschüttler statt. Die geblottete Membran wurde zunächst für eine Stunde mit Blockierungslösung und anschließend eine Stunde mit Primärantikörper-Lösung inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper folgte ein Waschschrift, bestehend aus zweimaligem Abspülen mit Waschpuffer sowie einmal 15 minütiger und zweimal 5 minütiger Inkubation mit Waschpuffer. Die Membran wurde danach für eine Stunde mit Sekundärantikörper-Lösung inkubiert, anschließend folgte erneut der bereits beschriebene Waschschrift. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran mit ECLTM-Detektionslösung überschichtet, eine Minute inkubiert, überflüssige Lösung abgegossen und die Membran anschließend in Haushaltsfrischhaltefolie eingeschlagen. Die Belichtung der ECL[®]-Hyperfilme erfolgte in einer Autoradiographie-Kassette. Die Belichtungsdauer schwankte bei den durchgeführten Versuchen je nach Signalintensität zwischen 20 Sekunden und 35 Minuten.

Die Entwicklung der belichteten ECL[®]-Hyperfilme erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit Entwickler D19 und Fixierer Unifix.

D.2.5.12 Quantitativer Western-Blot

Zur Ermittlung der HCII-Konzentration wurde die Probe zusammen mit mehreren Verdünnungsstufen von Standard-Humanplasma bekannter Konzentration in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe D.2.5.9), auf eine PVDF-Membran geblottet (siehe D.2.5.10) und per Chemilumineszenz-Immundetektion (siehe D.2.5.11) nachgewiesen. Für die quantitative Auswertung wurden die entwickelten ECL[®]-Hyperfilme mit der CCD-Videokamera auf dem Transilluminator mit GloScreenTM UV Conversion Screen und der PhotoFinish ZSoft V3.0 Software (siehe D.1.13) digital dokumentiert. Die HCII-Konzentration der Probe wurde densitometrisch mit Hilfe der WinCam V2.2 Software (siehe D.1.13) durch Vergleich mit der Konzentration der bekannten Standards errechnet.

D.2.5.13 Coomassieblau-Färbung

Der Nachweis von Proteinen in Gelen und auf PVDF-Membranen nach der Chemilumineszenz-Immundetektion (zum Anfärben der Proteingrößenmarker) erfolgte durch Coomassie-Färbung. Die Färbemethode beruht auf der Reaktion eines Triphenylmethanfarbstoffes mit den Aminogruppen von Lysinresten und dem freien Aminoterminus von Proteinen in alkoholischer Lösung¹. Die angefärbte Membran kann anschließend unter die entwickelten ECL[®]-Hyperfilme gelegt werden, auf denen je nach Belichtungsdauer eine oder mehrere Banden der Proteingrößenmarker unspezifisch von den verwendeten Antikörpern angefärbt werden, um die Proteingrößen von detektierten Proteinen abzuschätzen.

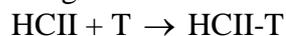
Lösungen:

- | | |
|----------------|---|
| - Färbelösung: | 1 Tablette Coomassie R-350
150 mL dH ₂ O
100 mL Isopropanol p.A.
50 mL Essigsäure p.A.
durch Filterpapier filtrieren |
| - Entfärber: | 700 mL dH ₂ O
200 mL Isopropanol
100 mL Essigsäure |

Gele wurden bei 50 °C für 20 Minuten in Färbelösung angefärbt, PVDF-Membranen für 5 Minuten. Anschließend wurde das Gel bzw. die Membran bei 50°C in einem Entfärberbad unter mehrmaligem Wechseln der Lösung so lange entfärbt, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen war und die Proteinbanden gut sichtbar waren.

D.2.5.14 Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung

Die irreversible Reaktion von Heparinkofaktor II (HCII) und Thrombin (T) stellt eine chemische Reaktion zweiter Ordnung dar:



Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei sowohl von der Konzentration von Heparinkofaktor II [HCII] als auch von der Konzentration von Thrombin [T] abhängig und läßt sich durch das Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung beschreiben:

$$-d[\text{T}]/dt = k_2 \cdot [\text{T}] \cdot [\text{HCII}]$$

Die Abnahme der Thrombinkonzentration über den Zeitverlauf $-d[\text{T}]/dt$ ist dabei gleich dem Produkt aus der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung k_2 und den Konzentrationen von HCII und Thrombin.

Die Gleichung enthält zwei Unbekannte ([T] und [HCII]), die experimentell nicht bestimmt werden können. Das Problem läßt sich dadurch umgehen, daß eine der Komponenten, hier HCII, im großen Überschuß in die Reaktion eingesetzt wird (Faktor ≥ 10), so daß diese als unveränderliche Größe betrachtet werden kann. Mit $k' = k_2 \cdot [\text{HCII}]_{\text{konst.}}$ ergibt sich ein neues Geschwindigkeitsgesetz :

$$-d[\text{T}]/dt = k' \cdot [\text{T}]$$

¹ Schägger *et al.* 1988

bzw. in seiner integrierten Form :

$$k' \cdot t = \ln([T]_0/[T]_t)$$

Man spricht von einer Reaktion pseudo-erster Ordnung.

Trägt man $\ln([T]_0/[T]_t)$ gegen t auf, so entspricht die Steigung der Geraden k' . Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung errechnet sich aus $k' = k_2 \cdot [\text{HCII}]_{\text{konst.}}$ durch Division von k' durch die eingesetzte HCII-Konzentration $[\text{HCII}]_{\text{konst.}}$.

Die Durchführung des nachfolgend beschriebenen Tests beruht auf den Arbeiten von Derechin *et al.*, Ciaccia *et al.* und Hayakawa *et al.*¹

HCII reagiert sowohl in der Gegenwart als auch in der Abwesenheit von GAGs mit Thrombin, wobei Thrombin als HCII-Thrombin-Komplex irreversibel inaktiviert wird.



Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgt durch Umsetzung des synthetischen Substrates Chromozym TH (Tosyl-Glycyl-Prolyl-Arginin-4-Nitranilid-Acetat) durch Thrombin. Thrombin spaltet von Chromozym TH 4-Nitroanilin ab, welches photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann. Die Konzentration an aktivem, nicht inhibiertem Thrombin ist dabei jeweils proportional zur Absorptionsänderung, so daß folgt:

$$k' \cdot t = \ln[\Delta A/\text{min}]_0/[\Delta A/\text{min}]_t$$

Wird nun der natürliche Logarithmus vom Verhältnis der Absorptionsänderungen ($\ln[\Delta A/\text{min}]_0/[\Delta A/\text{min}]_t$) gegen die Reaktionszeit t aufgetragen entspricht die Geradensteigung k' . Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_2 ergibt sich aus dem Quotienten von k' und der eingesetzten HCII-Konzentration : $k_2 = k'/[\text{HCII}]$ (Einheit: $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Lösungen:

- TS/PEG-Puffer pH 7,4:	20 mM Tris HCl 150 mM NaCl 0,1% (w/v) PEG 8000
- TS/PEG-Puffer + BSA pH 7,4:	TS/PEG-Puffer + 0,2 mg/ml BSA
- Chromozym TH-Lösung:	150 μM in TS/PEG
- Thrombin-Lösung:	20 nM in TS/PEG
- HCII-Lösung:	250 nM in TS/PEG
- Heparin-Lösung:	100 U/ml = 570 $\mu\text{g/ml}$ in TS/PEG
- Dermatansulfat-Lösung:	10 mg/ml Heparin-freies Dermatansulfat in TS/PEG (s.u.)
- T/PEG-Puffer pH7,4:	30 mM Tris HCl 0,2 % (w/v) PEG 8000
- NEP-Lösung:	240 mM NaNO_2 1,8 M Essigsäure 0,1% (w/v) PEG 8000

¹ Derechin *et al.* 1990, Ciaccia *et al.* 1997 a, Hayakawa *et al.* 2000 a

Zur Entfernung von Heparinverunreinigungen im Dermatansulfat wurde Dermatansulfat mit einer Konzentration von 10 mg/ml in NEP-Lösung gelöst und für 80 Minuten bei RT inkubiert¹. Anschließend wurde die Lösung für 20 Stunden bei 4°C gegen TS/PEG-Puffer in einer Slide-A-Lyzer Dialyseeinheit mit einer Ausschlußgrenze von 3500 Da dialysiert.

Ausgangsmaterial für die Bestimmungen der Geschwindigkeitskonstanten war HCII, welches mit einem NaCl-Stufengradienten (siehe D.2.5.2.2) bei einer Salzkonzentration von 300 mmol/l von der FPLC-Heparin-Sepharose-Säule eluierte. Die HCII-haltigen Lösungen wurden 1:2 mit T/PEG-Puffer verdünnt, wodurch der FPLC-Elutionspuffer in TS/PEG-Puffer überführt wurde. Anschließend wurden die HCII-Lösungen mit TS/PEG-Puffer auf eine HCII-Konzentration von 250 nmol/l verdünnt. Die Bestimmung der HCII-Konzentrationen erfolgte mittels ELISA (siehe D.2.5.1).

Folgende HCII-Varianten wurden untersucht:

- Wildtyp-HCII aus CHO DUKX B1 Zellen reduziert und alkyliert bzw. unbehandelt
- HCIIΔC F195C/P52C aus CHO DUKX B1 Zellen reduziert und alkyliert bzw. unbehandelt

Für die Messungen wurde jeweils im Wechsel ein 100% Thrombin-Wert (ungehemmtes Thrombin ohne HCII-Zugabe, $\Delta A/\text{min}$ bei $t=0$) und eine HCII-Thrombin-Komplexierung gemessen. Die Komplexierungszeit hing dabei von der Probe und dem Vorhandensein, bzw. Fehlen von GAGs ab (siehe E.15). Die Komplexierung begann mit der Zugabe der Thrombinlösung und wurde durch die Zugabe der Chromozym TH-Lösung beendet. Alle Komponenten wurden bei Raumtemperatur wie folgt direkt in einer Einweg-Halbmikroküvette gemischt.

<u>100 % Thrombin-Wert</u>	<u>HCII-Thrombin-Komplexierung</u>
40 μl TS/PEG-Puffer	40 μl HCII-Lösung
10 μl GAG-Lösung oder TS/PEG	10 μl GAG-Lösung oder TS/PEG
50 μl Thrombin-Lösung	50 μl Thrombin-Lösung
Inkubation für 5 Sekunden bis 5 Stunden	
Zugabe von 500 μl Chromozym TH-Lösung	

Für Komplexierungen mit einer Dauer von mehr als einer Stunde wurde für einige Versuchsreihen TS/PEG-Puffer + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA verwendet. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Aktivität von Thrombin bei langer Inkubation deutlich abnahm (Ergebnisse nicht dargestellt). BSA fungierte hier als sog. "Schutzprotein", welches eine stabilisierende Wirkung auf die Thrombinaktivität hatte und für besser vergleichbare Bedingungen zwischen der ansonsten Protein-freien 100% Thrombinaktivitätsmessung und der Protein-haltigen, nur partiell gereinigten HCII-Lösung sorgte.

Nach Zugabe der Chromozym TH-Lösung wurde die (verbleibende) Thrombinaktivität durch Messung der Absorptionsänderung bei 405 nm ($\Delta A/\text{min}$) mit Hilfe der UV1602 V3.5-Software (siehe D.1.13) bestimmt. Um Schwankungen von Einzelmessungen zu kompensieren, besonders bei kurzen Reaktionszeiten, wurden möglichst viele unabhängige Messungen durchgeführt und der Mittelwert der Absorptionsänderungen bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante k' ergab sich wie bereits geschrieben durch Bestimmung der Geradensteigung mittels linearer Regression aus den errechneten Mittelwerten und dem Nullpunkt (Anfangsaktivität bei $t=0$: $\ln[\Delta A/\text{min}]_0/[\Delta A/\text{min}]_{t=0}=0$). Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_2 errechnete sich dann aus dem Quotienten von k' und der eingesetzten HCII-Konzentration : $k_2 = k'/[\text{HCII}]$.

¹ Teien *et al.* 1976, Maaroufi *et al.* 1997

E Ergebnisse

E.1 Dreidimensionale Proteinmodellierungen

In Ermangelung von Röntgenstrukturdaten für HCII, anhand derer geeignete Aminosäurepositionen für den Einbau von zwei neuen Cysteinen hätten ermittelt werden können, die den N-Terminus mit dem Kern des Moleküls verbinden, mußte ein dreidimensionales Modell von HCII erstellt werden. Hierfür diente der Swiss Modell Server der Glaxo Wellcome Experimental Research in Genf, welcher ein 3D-Proteinstrukturmodell für eine vorgegebene Proteinsequenz aus bekannten 3D-Strukturen von verwandten Proteinen derselben Proteinfamilie modelliert¹ (siehe D.2.3). Ein solches Modell als Grundlage für die Auswahl geeigneter Aminosäurepositionen zu verwenden ist ein sinnvoller Ansatz, da die Serpine trotz teilweise nur relativ geringer Aminosäureidentität von ca. 30% eine hoch konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen (siehe B.4.1).

Wie in der Einleitung dargestellt, bindet nach der vorliegenden Vorstellung der saure Aminoterminus von HCII in Abwesenheit von GAGs an die basische Helix D und diese beiden Molekülbereiche sollten durch eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft werden (siehe Abbildung 8 und Abbildung 10).

Aus der Literatur geht hervor, daß die Mutation von basischen Aminosäuren, welche für die HCII-Aktivierung durch GAGs wichtig sind, fast durchgehend zu verringerter HCII-Aktivität in der Gegenwart von Heparin und/oder Dermatansulfat führt². Aus diesem Grund schien die Mutation einer dieser Aminosäuren zu Cystein wenig attraktiv, obwohl sie dem Modell nach direkt mit dem N-Terminus interagieren und obwohl beim Antithombin eine Disulfidbrücke zwischen Cys8 und Cys128 besteht³. Cys128 im AT würde His188 im HCII entsprechen. Es wurde jedoch gezeigt, daß die Mutation von His188 zu einer deutlichen Abnahme der HCII-Aktivität in der Gegenwart von Dermatansulfat führt⁴.

Weiterhin wurde (allerdings erst nach Beginn dieser Arbeit) gezeigt, daß Arg200 an der intramolekularen Interaktion mit dem sauren N-terminalen Bereich von HCII beteiligt ist⁵.

Ausgehend von diesen Literaturdaten erschien die carboxyterminal der basischen α -Helix D gelegene Region für den Einbau eines der beiden Cysteine geeignet. Erschwert wurde die Modellierung allerdings dadurch, daß sich das Ausmaß der α -helicalen Struktur der α -Helix D möglicherweise durch die An- bzw. Abwesenheit von GAGs ändern kann⁶.

Die Auswahl einer zweiten Aminosäureposition für den Einbau eines Cysteins im sauren Bereich des Aminoterminus von HCII war deutlich problematischer. Der N-Terminus von HCII zeigt keine Sequenzhomologie zu anderen Serpinen, so daß mit Swiss Model kein 3D-Modell für diese Region erstellt werden konnte. Zudem ist unklar, wie die saure Region mit der GAG-Bindestelle interagiert. Aus der Literatur sind lediglich einige Aminosäurepositionen bekannt, deren Mutation sich deutlich nachteilig auf die Aktivierung von HCII durch Heparin und/oder Dermatansulfat auswirkt (F67V, Y60F, L61A)⁷.

¹ Peitsch 1995 a & b, Peitsch 1996

² Ragg *et al.* 1990 a & b, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991, Blinder *et al.* 1989, Colwell *et al.* 1999

³ Mourey *et al.* 1993, Skinner *et al.* 1997

⁴ Ragg *et al.* 1990 b

⁵ Ciaccia *et al.* 1997 b

⁶ Whinna & Church 1994

⁷ Ragg *et al.* 1990 a & b

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren nur wenige Röntgenstrukturdaten von vorwiegend gepaltenen Serpinen vorhanden, anhand derer eine HCII-Modellierung durchgeführt werden konnte.

Ausgehend von der Vorüberlegung, daß der Bereich am carboxyterminalen Ende der α -Helix D von HCII für den Einbau eines der neuen Cysteine geeignet war, sollte die α -Helix D und der carboxyterminal angrenzende strangverbindende Bereich zum β -Faltblatt A möglichst genau modelliert werden. Wie aus Tabelle 15 zu ersehen ist, sind zahlreiche Serpine heterogen bezüglich der Anzahl von Aminosäuren, welche α -Helix D mit Strang 2 im β -Faltblatt A verbinden. Für die erste Modellierung von HCII wurden daher nur Röntgenstrukturdaten von solchen Serpinen verwendet, die in der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und dem Beginn von Strang 2 im β -Faltblatt A dieselbe Anzahl von Aminosäuren aufweisen wie HCII.

Da alle hierfür zur Verfügung stehenden Röntgenstrukturdaten von gespaltenen Serpinen stammten, wurde als einziges verfügbares ungespaltenes Serpin Ovalbumin einbezogen (siehe D.2.3).

Serpin	Aminosäuresequenz
Heparinkofaktor II	-----SSKYEITTIHNLFRKLTHRLFRRNFG--YTLRS
α_1 -Antitrypsin	-----PAEQIHEGFQELLRLNQPDSQ--LQLTT
Antithrombin	-----TSDQIHFFFAKLNCRLYRKANK-SSKLVS
C ₁ -Inhibitor	-----CVHQALKGFTTKG-----VTS
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1	-----IDDKGMAPALRHLYKELMGPWNK--DEIST
Thyroxin-bindendes Globulin	-----PMVEIQHGFQHLICSLNFPKKE--LELQI
α_1 -Antichymotrypsin	-----LRQKFTQSFQHLRAPSISSSDE--LQLSM
α_2 -Antiplasmin	-----AGSGPCLPHLLSRLCQDLG-PG----AFRL
Ovalbumin (Huhn)	-GDSEIAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNPND--VYSFSL
Angiotensinogen	-CTSRLDAH-KVLSALQAVQGLLVAQGRADSQAQLLLST
Corticosteroid-bindendes Globulin	-----SETEIQHGFQHLHQLFAKSDTS--LEMTM
Protein C Inhibitor	-----SEKELHRGFQQLLQELNQPDRDG--FQLSL
Protease Nexin	-----GVNGVGKILKKINKAIVSKKNK--DIVTV

Tabelle 15: Aminosäuresequenzvergleich von humanen Serpinen und Ovalbumin im Bereich der Helix D (nach Huber & Carrell 1989). Als Referenz für die Zuordnung von Aminosäuren zu den Sekundärstrukturelementen dient das zuerst röntgenkristallographisch charakterisierte α_1 -Antitrypsin. Grün unterlegt ist der Bereich der Proteine, welcher in α_1 -Antitrypsin die Helix D bildet, gelb der Bereich welcher den Beginn von Strang 2 in β -Faltblatt A darstellt. Bei HCII sind die Aminosäuren Ser171 bis Ser201 dargestellt (siehe hierzu H.1).

Aufgrund der Vielzahl von neuen Serpin-Röntgenstrukturdaten, die in Laufe der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden, konnten in Dezember 1999 zur Überprüfung der ersten Modellierung und zur Erstellung eines Modells, welches nur auf ungespaltenen Serpinen basierte, zwei neue Modellierungen mit der Version 3.5 des Swiss Model Servers durchgeführt werden (siehe D.2.3 und Abbildung 37 bis Abbildung 41).

Auf den nächsten Seiten sind die errechneten Modelle jeweils als Gesamtansicht und als Detailansicht im Bereich der Aminosäuren 180 bis 202 dargestellt, wobei bei letzteren vom carboxyterminalen Ende her durch die Helix D geschaut wird. In allen Abbildungen ist Phenylalanin 195 gegen Cystein ausgetauscht, um die Orientierung des Cysteinrestes zur Helix D beurteilen zu können.

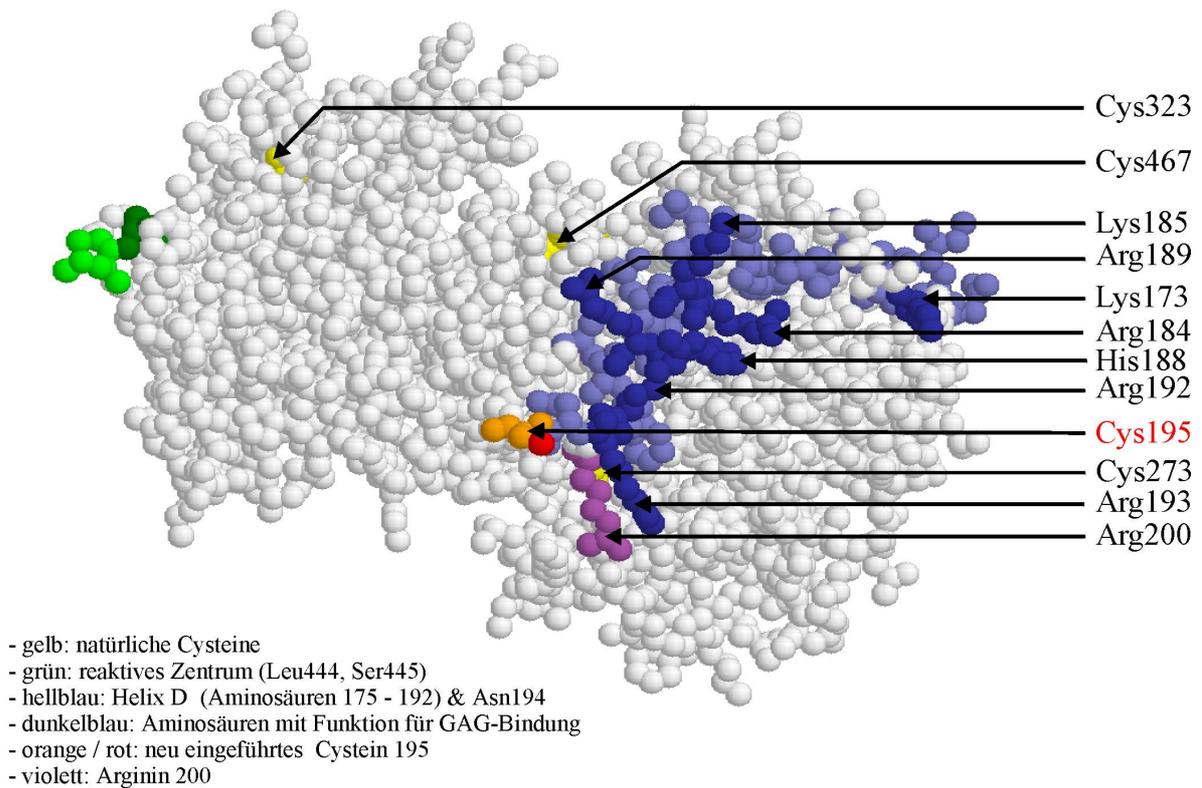


Abbildung 35: Dreidimensionales HCII-Modell der Aminosäuren 114 bis 476 (Mutation F195C) modelliert mit Swiss Model V.1.1, basierend auf 3D-Strukturdaten von ungespaltenem Ovalbumin, gespaltenem α_1 -Antitrypsin, gespaltenem α_1 -Antichymotrypsin und gespaltenem Protein C Inhibitor.

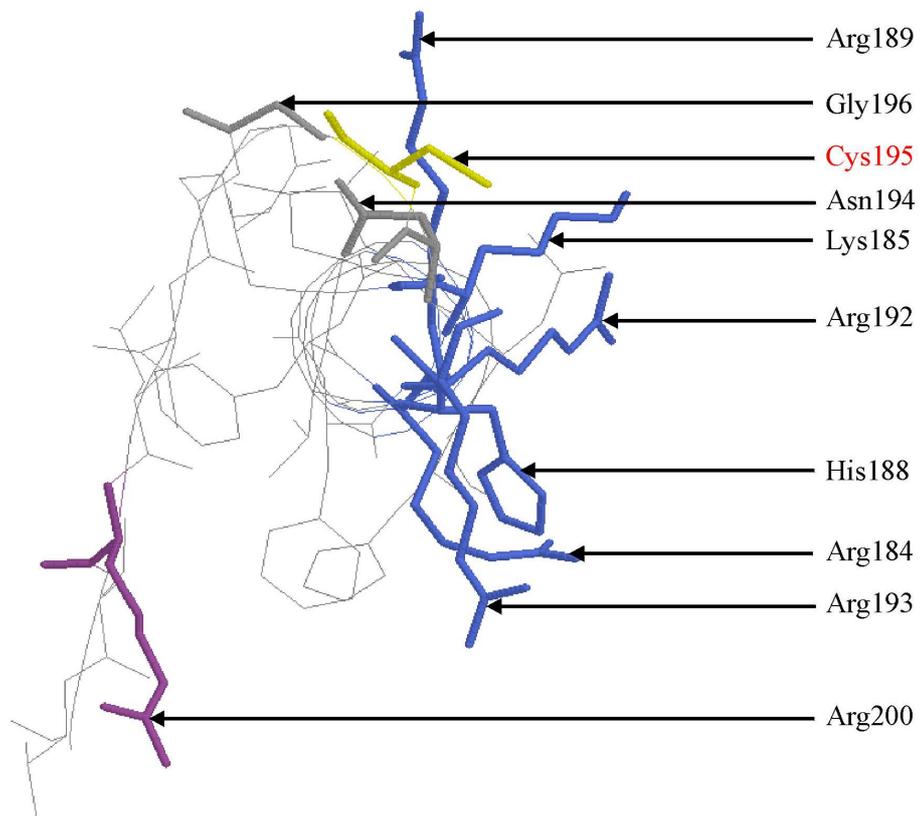


Abbildung 36: Detailansicht der Aminosäuren 180 bis 202 von obigem Modell. Blau hervorgehoben sind Aminosäuren, die an der GAG-Bindung beteiligt sind.

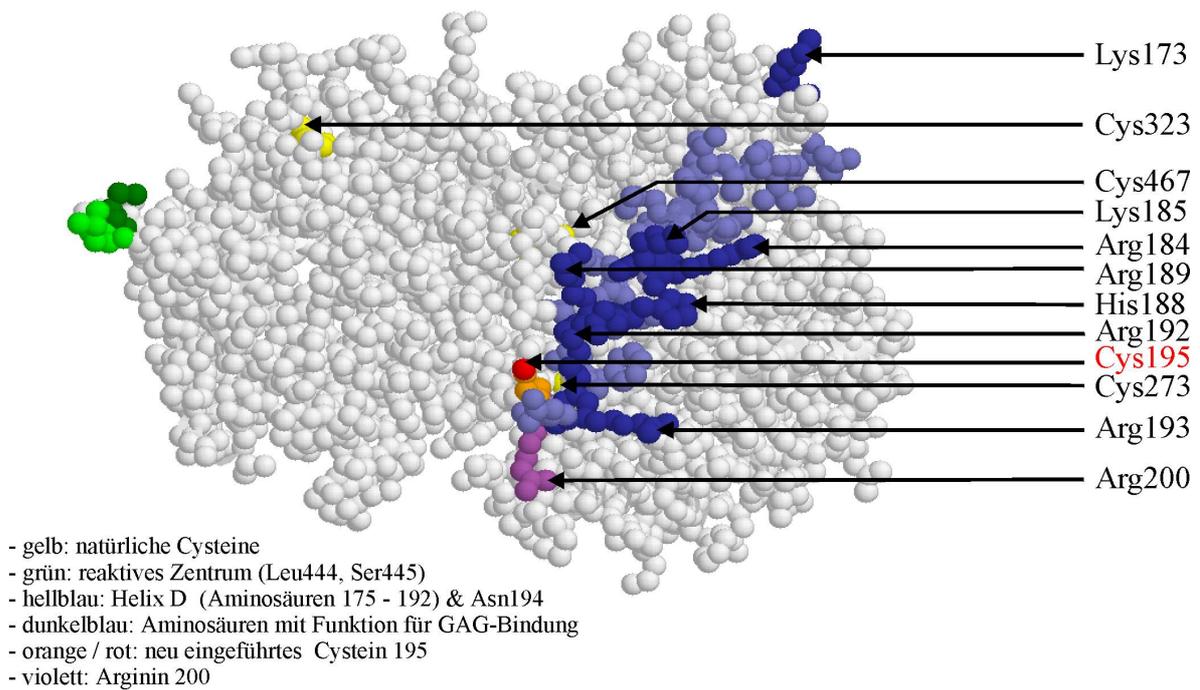


Abbildung 37: dreidimensionales HCII-Modell der Aminosäuren 105 bis 480 (Mutation F195C) modelliert mit Swiss Model V3.5, basierend auf Röntgenstrukturdaten von α_1 -Antitrypsin und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (beide ungespalten).

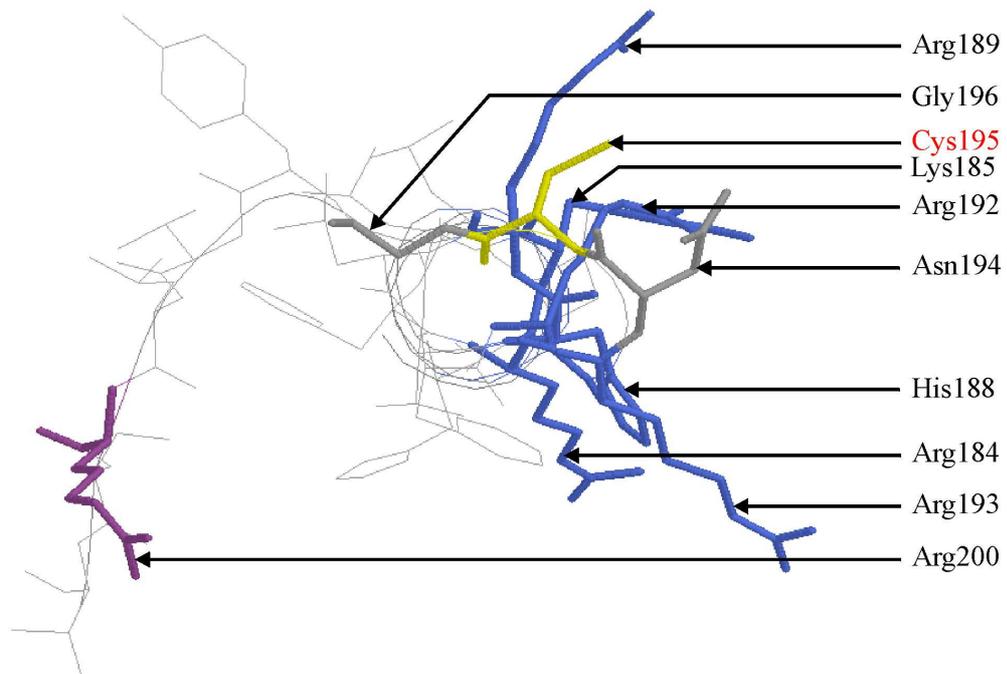


Abbildung 38: Detailansicht der Aminosäuren 180 bis 202 von obigem Modell. Blau hervorgehoben sind Aminosäuren, die an der GAG-Bindung beteiligt sind.

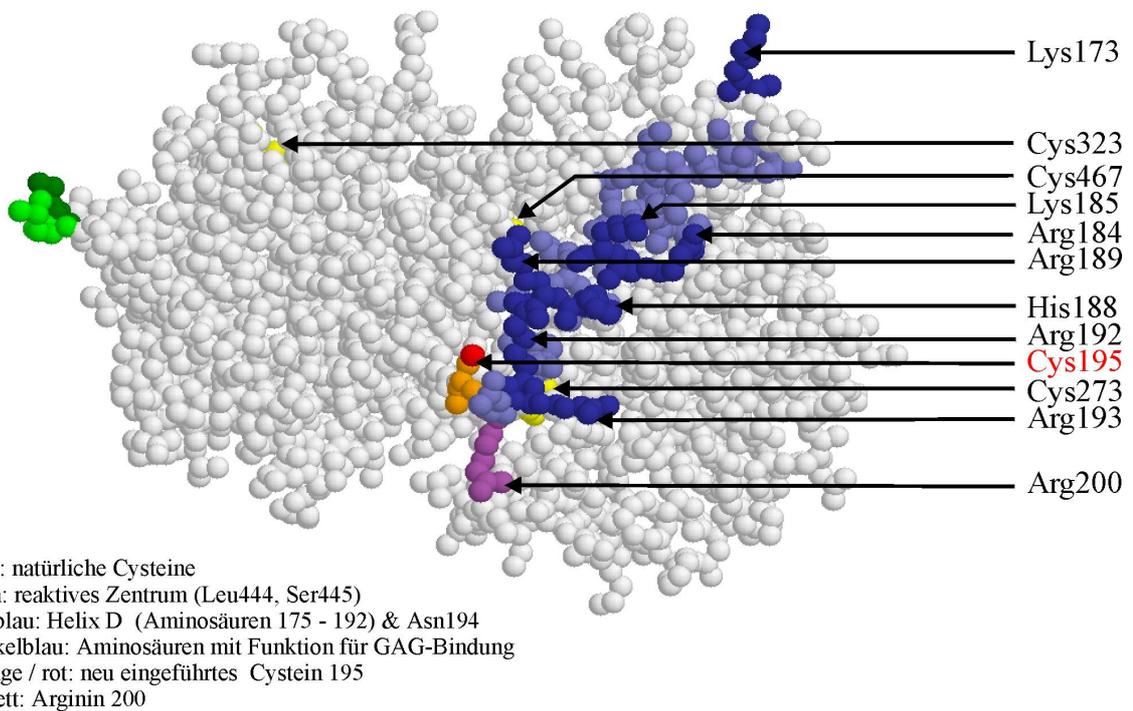


Abbildung 39: dreidimensionales HCII-Modell der Aminosäuren 103 bis 480 (Mutation F195C) modelliert mit Swiss Model V3.5, basierend auf Röntgenstrukturdaten von α_1 -Antitrypsin, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1, Antithrombin und Ovalbumin (alle ungespalten).

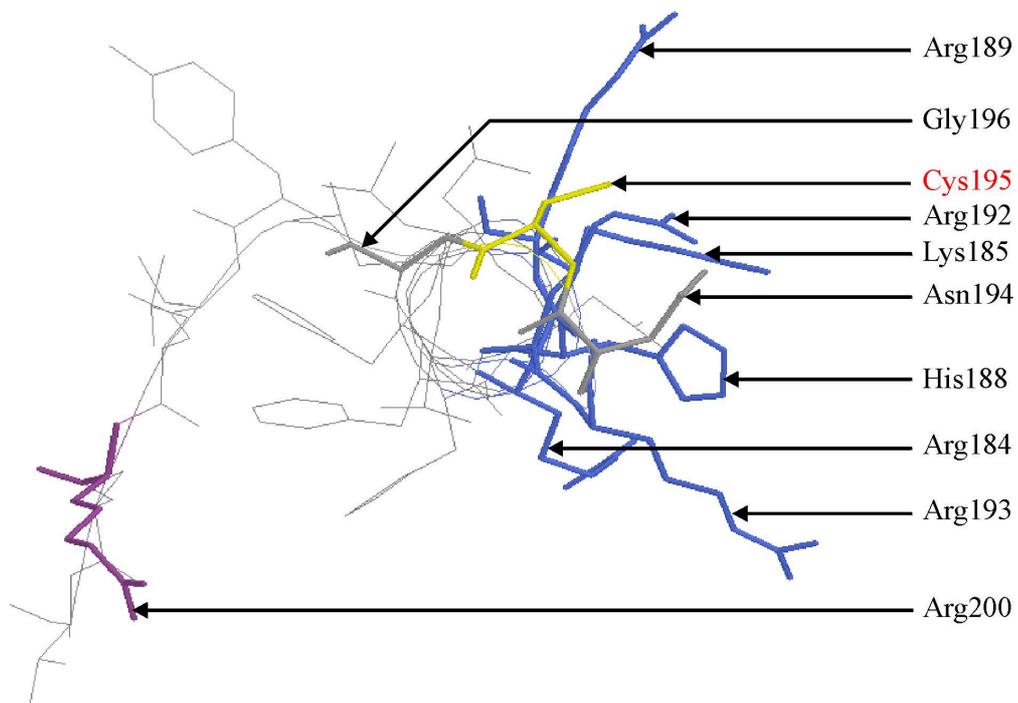


Abbildung 40: Detailansicht der Aminosäuren 180 bis 202 von obigem Modell. Blau hervorgehoben sind Aminosäuren, die an der GAG-Bindung beteiligt sind.

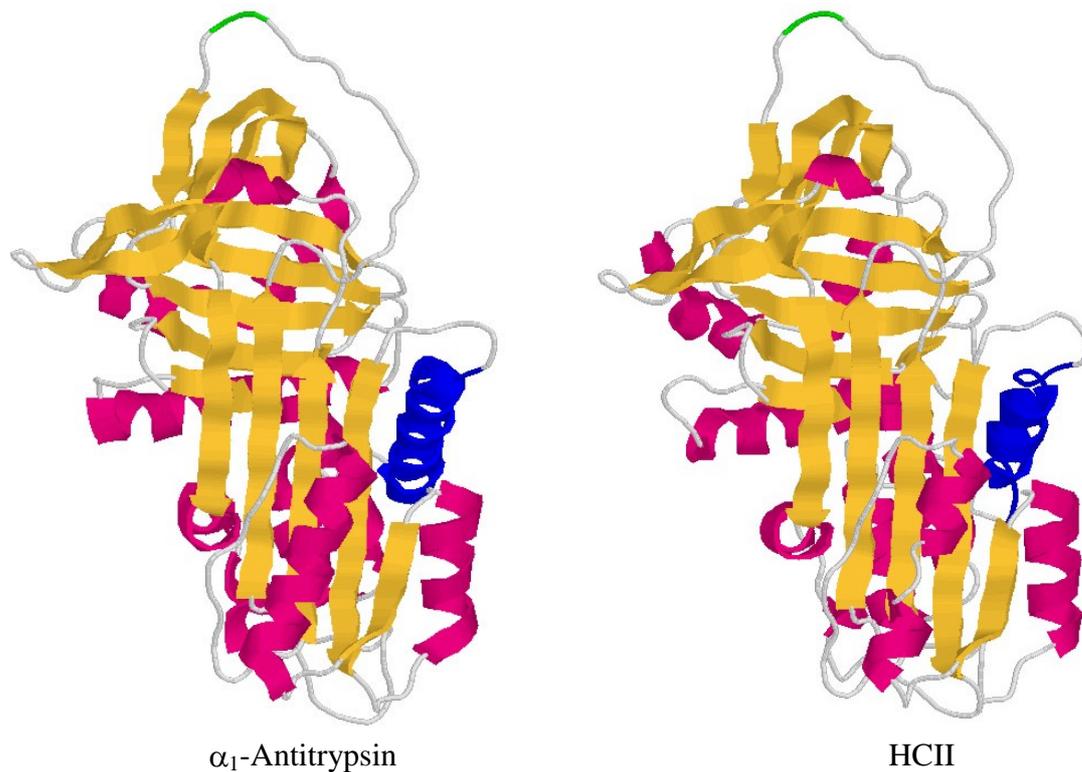


Abbildung 41: Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen von ungespaltenem α_1 -Antitrypsin (Röntgenstrukturdaten) (links) und dem Swiss Model Modell der Aminosäuren 103 bis 480 von HCII (rechts), basierend auf Röntgenstrukturdaten von α_1 -Antitrypsin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, Antithrombin und Ovalbumin (alle ungespalten). rot: α -Helices, gelb: β -Faltblattstrukturen, blau: Helix D, grün: aktives Zentrum

Die errechneten HCII-Modelle zeigen (siehe Abbildung 41) die für Serpine typischen Sekundär- und Tertiärstrukturmerkmale, wobei sich die ersten ca. 100 Aminosäuren von HCII aufgrund mangelnder Homologie zu anderen Serpinen nicht modellieren ließen. Bei allen drei Modellen befindet sich das aktive Zentrum in einer exponierten Position, und die basischen Aminosäuren mit Funktion für die GAG-Bindung ebenso wie Arg200 befinden sich auf der Oberfläche des Moleküls und weisen vom Moleküllern fort. Innerhalb der Helix D weisen die hydrophoben Aminosäuren zum Moleküllern und damit zur anderen Seite als die basischen Aminosäuren (graphisch nicht hervorgehoben). Deutliche Unterschiede zwischen der ersten Modellierung, welche überwiegend auf gespaltenen Serpinen beruht und den späteren Modellierungen, welche ausschließlich auf ungespaltenen Serpinen basieren, zeigen sich am Aminoende der Helix D und besonders der Lage von Lys173. Beim Blick durch die Helix D fällt auf, daß die basischen Aminosäuren in der ersten Modellierung einen Bereich von ca. 180° abdecken, wohingegen sie bei den neueren Modellierungen enger zusammenstehen. Aufgrund der ersten 1996 durchgeführten Modellierung erschien die Position 195 als gut geeignet für den Einbau eines Cysteins, da die Thiolgruppe in dieselbe Richtung weist, wie die basischen Aminosäuren. Ein HCII-Modell von Whinna & Church¹, welches nicht durch Swiss Model berechnet wurde, zeigt ebenfalls Phe195 auf der HCII-Oberfläche mit derselben Orientierung wie die basischen Aminosäuren der Helix D. Bei einer Modellierung mit dem Austausch Asn194→Cys194 zeigte die Thiolgruppe in die entgegengesetzte Richtung (Ergebnisse nicht abgebildet). Anhand der 1999 durchgeführten Modellierungen mit ungespaltenen Serpinen erscheint die Position Asn194 besser geeignet zu sein. Auch zwischen diesen beiden Modellierungen sind Unterschiede zu erkennen, wenn auch weniger signifikant. Am auffälligsten ist die unterschiedliche Stellung von His188 in der Helix D.

¹ Whinna & Church 1994

Bei allen drei Modellen befinden sich die drei natürlich vorkommenden Cysteine eher im Inneren des Moleküls. Um jedoch von vornherein die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen einem der neu eingeführten Cysteine und einem der drei natürlich vorkommenden Cysteine bei der HCII-Faltung im endoplasmatischen Retikulum auszuschließen, wurden die drei natürlich vorkommenden Cysteine gegen Serine ausgetauscht. Die Arbeit von Church *et al.*¹ hatte bereits gezeigt, daß die Alkylierung der drei Cysteine mit Iodacetamid oder Iodacetessigsäure keinen Einfluß auf die Inhibierung von Thrombin in Gegenwart von Heparin hat, so daß die drei natürlich vorkommenden Cysteine vermutlich nicht essentiell für die Komplexierung mit Thrombin sind und der Austausch gegen Serin keinen großen Einfluß haben dürfte.

Für die Position des zweiten neu eingeführten Cysteins in der aminoterminalen HCII-Region wurden in Ermangelung von Röntgenstrukturdaten und 3D-Modellen die Positionen Pro52 und Gly54 am Beginn des ersten sauren Clusters gewählt, sowie Ser68 am Beginn des zweiten sauren Clusters (siehe Abbildung 8), von dem bekannt ist, daß die Mutation zu Glu68 sich nur geringfügig auf die Aktivierung von HCII durch Heparin auswirkt². Es sei angemerkt, daß der Aminoterminus von AT, obwohl in seiner Sequenz völlig anders, sich auch in der Nachbarschaft der Helix D befindet und über eine Disulfidbrücke mit ihr verbunden ist³. Projiziert auf HCII würde Cys128 im AT His188 im HCII entsprechen. Position 188 ist jedoch ungeeignet für die Mutagenese, da das dort befindliche Histidin eine wichtige Funktion bei der HCII-Aktivierung durch Dermatansulfat hat⁴.

E.2 Konstruktion von Plasmiden

Anmerkung: Die Konstruktion von Plasmiden wird einmal exemplarisch anhand der Konstruktion von pHCIIDC F195C/G54C (siehe E.2.2.1) dargestellt, die Ergebnisse der durchgeführten Sequenzierungen werden vergleichend unter Abschnitt E.3 aufgelistet.

E.2.1 Konstruktion von Subklonen

Für die Konstruktion der drei Plasmide pSBR1, pSBR3 und pSBR4 wurden PCR-Mutagenese-Produkte "blunt end" in den pCR-ScriptTMSK(+) cloning Vektor (siehe Abbildung 18) ligiert, welcher mit der Restriktionsendonuclease *SrfI* in der Basenpaarposition 728 des Vektors geöffnet worden war. Die Orientierung der eingebauten DNA-Fragmente wurde mittels Restriktionsspaltungen (siehe D.2.4.6) wie nachfolgend dargestellt ermittelt. Abgebildet ist jeweils die Plasmidkarte mit der ermittelten Insert-Orientierung.

E.2.1.1 Konstruktion von pSBR1

Für die Konstruktion von pSBR1 wurde das PCR-Mutagenese-Produkt mit der Mutation F195C "blunt end" in den pCR-ScriptTM SK(+) cloning Vektor ligiert (siehe D.2.4.10.1.1). Das Insert hatte eine Länge von 434 Bp. Es beginnt innerhalb der HCII-cDNA bei Basenpaarposition 331 im Codon für Aminosäure Leu110 und endete bei Bp 764 in Codon für Aminosäure Leu254 (siehe H.1). Die durchgeführte PCR-Mutagenese bewirkte den Austausch des Codons für Phe195 zu Cys195 und als Indikatormutation die Entfernung einer *RsaI*-Schnittstelle im Codon für Gly196.

¹ Church *et al.* 1987

² Ragg *et al.* 1990 a

³ Mourey *et al.* 1993, Skinner *et al.* 1997

⁴ Ragg *et al.* 1990 b

Die Bestimmung der Insert-Orientierung im Vektor und die Überprüfung der Indikatormutation erfolgte durch Restriktionsspaltungen mit *RcaI*, *RsaI*, *HindIII* und *AocI* einzeln oder in Kombination.

Enzym(e)	Orientierung I		Orientierung II	
	Schnittposition(en)	Fragmentgröße(n) in Bp	Schnittposition(en)	Fragmentgröße(n) in Bp
<i>HindIII</i>	691	3395	691	3395
<i>RcaI</i>	1142, 2309, 3317	1167, 1008, 1220	748, 2309, 3317	1561, 1008, 826
<i>RcaI</i> & <i>AocI</i>	843, 1142, 2309, 3317	299, 1167, 1008, 921	748, 1048, 2309, 3317	299, 1262, 1008, 826
<i>RsaI</i>	657, 2962	2305, 1090	657, 2962	2305, 1090

Tabelle 16: Charakterisierende pSBR1-Restriktionsspaltungen und dadurch entstehende Fragmentgrößen.

Die durchgeführten Restriktionsspaltungen zeigten, daß das Insert in der abgebildeten Orientierung I in das Plasmid eingebaut wurde.

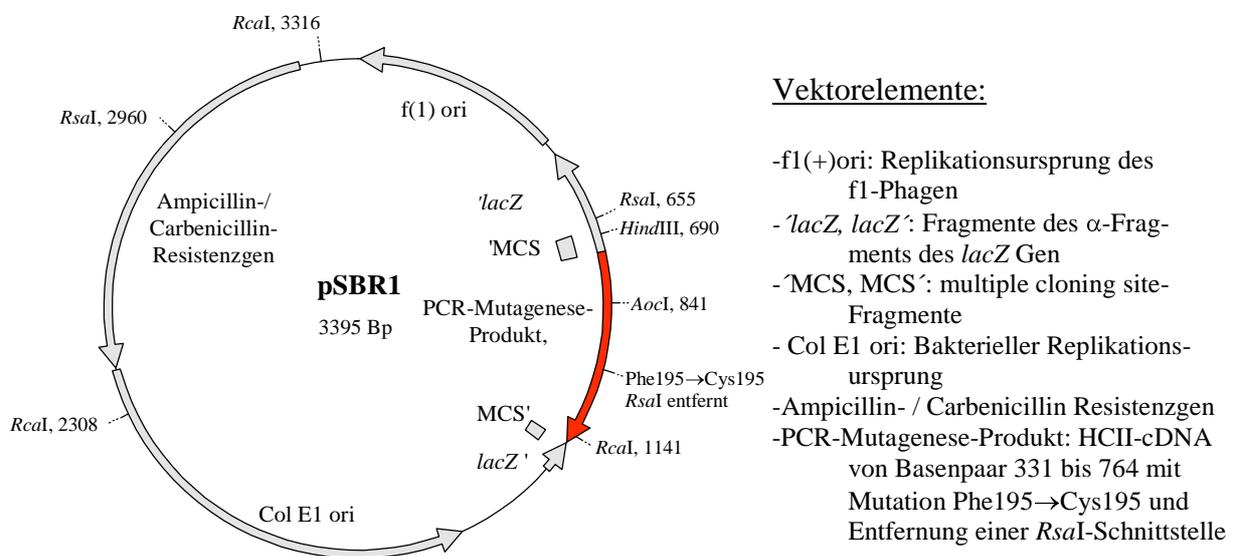
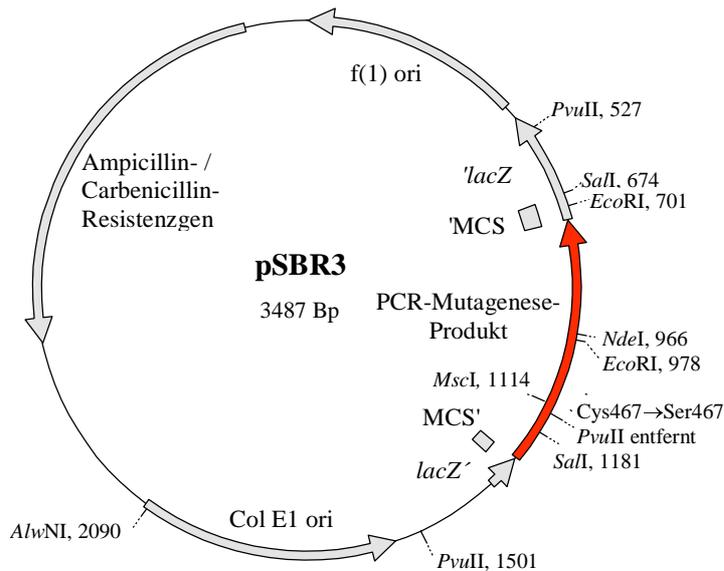


Abbildung 42: Aufbau und Elemente von pSBR1.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

E.2.1.2 Konstruktion von pSBR3

Für die Konstruktion von pSBR3 wurde das Overlap-PCR-Mutagenese-Produkt mit der Mutation C467S "blunt end" in den pCR-Script™ SK(+) cloning Vektor ligiert (siehe D.2.4.10.1.2). Das Insert hatte eine Länge von 526 Bp. Es beginnt innerhalb der HCII-cDNA in Basenpaarposition 1288 im Codon für Aminosäure Glu429 und endete bei Basenpaar 1813 im 3'-nichttranslatierten Bereich der cDNA (siehe H.1). Die durchgeführte PCR-Mutagenese bewirkte den Austausch des Codons für Cys467 zu Ser467 und damit verbunden gleichzeitig die Entfernung einer *PvuII*-Schnittstelle als Indikatormutation. Die Bestimmung der Insert-Orientierung im Vektor und die Überprüfung der Indikatormutation erfolgte durch Restriktionsspaltungen mit *PvuII*, *EcoRI*, *NdeI*, *SalI*, *MscI* und *AlwNI* einzeln oder in Kombination.



Vektorelemente:

- f1(+)-ori: Replikationsursprung des f1-Phagen
- lacZ, lacZ': Fragmente des α -Fragments des lacZ Gen
- MCS, MCS': multiple cloning site-Fragmente
- Col E1 ori: Bakterieller Replikationsursprung
- Ampicillin- / Carbenicillin Resistenzgen
- PCR-Mutagenese-Produkt: HCII-cDNA von Basenpaar 1288 bis 1813 mit Mutation Cys467→Ser467 und Entfernung einer PvuII-Schnittstelle

Abbildung 43: Aufbau und Elemente von pSBR3.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

Enzym(e)	Orientierung I		Orientierung II	
	Schnittpositionen	Fragmentgrößen in Bp	Schnittpositionen	Fragmentgrößen in Bp
<i>EcoRI</i>	702, 979	277, 3210	702, 1001	299, 3188
<i>NdeI</i> & <i>AlwNI</i>	968, 2096	1128, 2359	1014, 2096	1082, 2405
<i>PvuII</i>	530, 1504	974, 2513	530, 1504	974, 2513
<i>SalI</i> & <i>MscI</i>	675, 1117, 1182	440, 69, 2978	675, 798, 867	123, 69, 3295

Tabelle 17: Charakterisierende pSBR3-Restriktionsspaltungen und dadurch entstehende Fragmentgrößen.

Die durchgeführten Restriktionsspaltungen zeigten, daß das Insert in der abgebildeten Orientierung I in das Plasmid eingebaut wurde. Das Insert wurde anschließend -wie unter D.2.4.8.1 dargestellt- partiell sequenziert.

E.2.1.3 Konstruktion von pSBR4

Für die Konstruktion des Plasmids pSBR4 wurde ein PCR-Mutagenese-Produkt, welches gleichzeitig die Codons für die beiden Cysteine Cys273 und Cys323 zu Codons für Serine mutiert, "blunt end" in den pCR-Script™ SK(+) cloning Vektor ligiert (siehe D.2.4.10.1.3). Es hat eine Größe von 490 Bp und beginnt innerhalb der HCII-cDNA bei Basenpaarposition 684 im Codon für Aminosäure Glu228 und endete bei Bp 1173 in Codon für Aminosäure Lys391 (siehe H.1). Die eingefügten Mutationen bewirken den Austausch der Codons für Cys273 und Cys323 zu Codons für Serine. Als Indikatormutationen wurden eine *Bam*HI-Schnittstelle im Codon für Gly278 entfernt, sowie die beiden überlappenden Erkennungssequenzen für *Alw*NI und *Pfl*MI im Codon für Aminosäure Leu321.

Die Bestimmung der Insert-Orientierung im Vektor und die Überprüfung der Indikatormutationen, erfolgte durch Restriktionsspaltungen mit *Bam*HI, *Dra*I, *Alw*NI, *Xho*I, *Rca*I und *Sma*I einzeln oder in Kombination.

Enzym(e)	Orientierung I		Orientierung II	
	Schnittpositionen	Fragmentgrößen in Bp	Schnittpositionen	Fragmentgrößen in Bp
<i>AlwNI</i>	757, 2060	1303, 2148	1194, 2060	866, 2585
<i>BamHI</i> & <i>DraI</i>	720, 2403, 2422, 3114	1683, 19, 692, 1057	720, 2403, 2422, 3114	1683, 19, 692, 1057
<i>SmaI</i> & <i>RcaI</i>	716, 788, 1117, 2364, 3372	72, 329, 1247, 1008, 795	716, 831, 1156, 2364, 3372	113, 329, 1206, 1008, 795
<i>XhoI</i>	669, 1157	488, 2963	669, 787	118, 3333

Tabelle 18: Charakterisierende pSBR4-Restriktionsspaltungen und dadurch entstehende Fragmentgrößen.

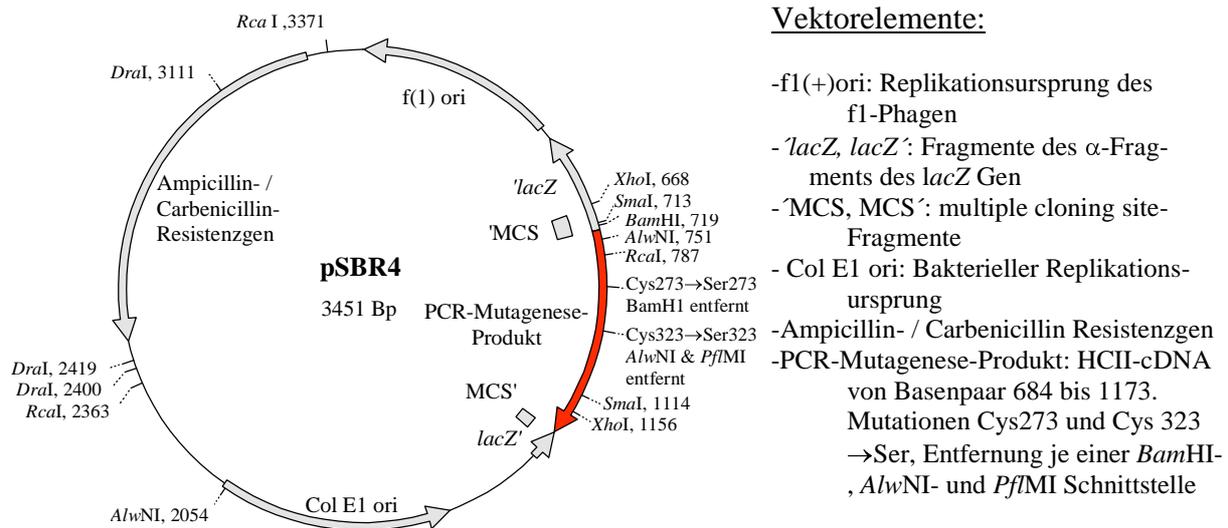


Abbildung 44: Aufbau und Elemente von pSBR4.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungssequenz dar.

Die durchgeführten Restriktionsspaltungen zeigten, daß das Insert in der Orientierung I in das Plasmid eingebaut wurde. Das Insert wurde anschließend -wie unter D.2.4.8.1 dargestellt- partiell sequenziert.

E.2.2 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Die Expressionsplasmide pHCIIC273S/C323S, pHCIIC Δ C, pHCIIC Δ F195C, pHCIIF195C, pHCIIC Δ F195C/P52C, pHCIIC Δ F195C/G54C, pHCIIC Δ F195C/S68C und pSBR21 wurden wie unter D.2.4.10.2 und D.2.4.10.3 beschrieben konstruiert. Mit Ausnahme von pSBR21 handelt es sich bei allen Plasmiden um Derivate von pWTBiI. pWTBiI enthält in der *SacI*-Schnittstelle des Shuttle-Vektors pCDM8 die HCII-cDNA in der für die Expression korrekten Orientierung (siehe Abbildung 16). Durch PCR-Mutagenese wurden veränderte Teilsequenzen der HCII-cDNA geschaffen, die mit Hilfe von Restriktionsenzymen gegen die entsprechenden Sequenzen der Ausgangsvektoren ausgetauscht wurden. Die veränderten Eigenschaften der einzelnen Vektoren sind in Tabelle 19 dargestellt. Der Plasmidstammbaum, der den sukzessiven Entstehungsweg der Plasmide zeigt, ist in Abbildung 17 dargestellt.

pSBR21 enthält das *EcoRI*-Fragment der HCII-cDNA aus pHCIIC Δ F195C/P52C in der *EcoRI*-Schnittstelle des Shuttlevektors pcDNA3.1(+) in der für die Expression korrekten Orientierung (für eine Plasmidkarte von pSBR21 siehe Abbildung 27 Seite 84). Die beiden *EcoRI*-Schnittstellen in pHCIIC Δ F195C/P52C liegen im 5'- bzw. 3'-nicht-kodierenden Bereich der HCII-cDNA, so daß der kodierende Bereich der HCII-Variante vollständig in den neuen Expressionsvektor ligiert wurde.

Plasmid	Cys273 ↓ Ser273 <i>Bam</i> HI bei Gly278 entfernt	Cys323 ↓ Ser323 <i>Pfl</i> MI & <i>Alw</i> NI bei Leu321 entfernt	Cys467 ↓ Ser467 <i>Pvu</i> II bei Cys467 entfernt	Phe195 ↓ Cys195 <i>Rsa</i> I bei Gly196 entfernt	Pro52 ↓ Cys52 <i>Pfl</i> MI bei Thr47 entfernt	Gly54 ↓ Cys54 <i>Pfl</i> MI bei Thr47 entfernt	Ser68 ↓ Cys68 <i>Xmn</i> I bei Phe67 entfernt
pWTBiI	–	–	–	–	–	–	–
pHCII F195C	–	–	–	+	–	–	–
pHCII C273S/C323S	+	+	–	–	–	–	–
pHCIIΔC	+	+	+	–	–	–	–
pHCIIΔC F195C	+	+	+	+	–	–	–
pHCIIΔC F195C/P52C	+	+	+	+	+	–	–
pHCIIΔC F195C/G54C	+	+	+	+	–	+	–
pHCIIΔC F195C/S68C	+	+	+	+	–	–	+
pSBR21	+	+	+	+	+	–	–

Tabelle 19: Eigenschaften einschließlich der jeweiligen Indikatormutationen der HCII-cDNA-Varianten in den verschiedenen Expressionsvektoren. Der Pfeil (↓) kennzeichnet jeweils die Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins von der Ausgangsaminosäure (oberhalb des Pfeils) zur neuen Aminosäure (unterhalb des Pfeils). Für cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII siehe H.1.

Alle konstruierten Plasmide wurden durch Restriktionsspaltungen charakterisiert (siehe D.2.4.6). Die nachfolgende Tabelle zeigt die entstehenden Fragmentgrößen. Die cDNAs der Plasmide wurden zudem -wie unter D.2.4.8 beschrieben- ganz oder teilweise sequenziert (siehe E.3).

Plasmid	Restriktionsendonucleasen und entstehende Fragmentgrößen in Bp							
	<i>Alw</i> NI	<i>Alw</i> NI & <i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Nco</i> I & <i>Pfl</i> MI	<i>Pvu</i> II & <i>Xmn</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Rsa</i> I & <i>Sma</i> I	
pWTBiI	251, 450, 1568, 2006, 2296	251, 386, 450, 597, 971, 1910, 2006	524, 2479, 3568	483, 550, 814*, 880, 1809*, 2035	134, 134, 137, 220, 279, 651, 1280, 1544, 2192	25, 33, 51, 55, 94, 102, 157, 255, 358, 746, 1286, 1499, 1910	25, 33, 51, 55, 94, 102, 157, 255, 358, 480, 746, 806, 1499, 1910	
pHCII C273S/C23S	<i>Alw</i> NI & <i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Msc</i> I & <i>Sal</i> II	<i>Rca</i> I & <i>Sma</i> I			
	386, 450, 848, 971, 1910, 2006	3003, 3568	1684, 4887	69, 1125, 5377	329, 6242			
pHCIIΔC	<i>Alw</i> NI & <i>Eco</i> RI	<i>Aoc</i> I & <i>Rca</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Msc</i> I & <i>Sal</i> II	<i>Nco</i> I & <i>Pfl</i> MI	<i>Pvu</i> II & <i>Xmn</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sma</i> I
	386, 450, 848, 971, 1910, 2006	299, 6272	3003, 3568	69, 1125, 5377	483, 550, 880, 2035, 2623	134, 134, 137, 499, 651, 1280, 1544, 2192	25, 33, 51, 94, 102, 157, 255, 358, 746, 1286, 1499, 1910	6571

Plasmid	Restriktionsendonucleasen und entstehende Fragmentgrößen in Bp								
	<i>AlwNI</i>	<i>AocI</i> & <i>RcaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>NcoI</i> & <i>PflMI</i>	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i> & <i>XmnI</i>	<i>RcaI</i> & <i>SmaI</i>	<i>RsaI</i> & <i>SmaI</i>	<i>Sac I</i>
pHCIIΔC F195C	450, 1819, 2006, 2296	299, 6272	3003, 3568	483, 550, 880, 2035, 2623	2538, 4033	134, 134, 137, 499, 651, 1280, 1544, 2192	329, 6242	25, 33, 51, 55, 94, 102, 157, 255, 358, 806, 1226, 1499, 1910	2215, 4356
pHCII F195C	<i>AocI</i> & <i>RcaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>DraI</i>	<i>RsaI</i>					
	299, 6272	524, 2479, 3568	437, 2190, 3944	25, 33, 51, 55, 94, 102, 157, 255, 358, 1499, 1910, 2032					
pHCIIΔC F195C/P52C & pHCIIΔC F195C/G54C	<i>AocI</i> & <i>PstI</i>	<i>BamHI</i>	<i>NcoI</i> & <i>PflMI</i>	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i> & <i>XmnI</i>	<u>Anmerkung:</u> pHCIIΔC F195C/P52C und pHCIIΔC F195C/G54C besitzen für die verwendeten Restriktionsendonucleasen identische Schnittmuster.			
	384, 2154, 4033	3003, 3568	550, 880, 2035, 3106	2538, 4033	134, 134, 137, 499, 651, 1280, 1544, 2192				
pHCIIΔC F195C/S68C	<i>AocI</i> & <i>PstI</i>	<i>BamHI</i>	<i>NcoI</i> & <i>PflMI</i>	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i> & <i>XmnI</i>				
	384, 2154, 4033	3003, 3568	483, 550, 880, 2035, 2623	2538, 4033	134, 134, 137, 499, 1544, 1931, 2192				
pSBR21	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>SmaI</i>	<i>ScaI</i>				
	458, 6654	1684, 5428	1356, 1509, 4247	1613, 5499	7112				

Tabelle 20: Charakterisierende Restriktionsspaltungen von Expressionsplasmiden

*: Die *PflMI*-Schnittstelle in pWTBil bei Position 3208 wird im verwendeten *E. coli*-Stamm MC1061/P3 über das *dcm*-System methyliert. Die beiden mit "*" gekennzeichneten Fragmente werden aufgrund der Modifikation der Erkennungssequenz nicht durch *PflMI* gespalten und bilden zusammen ein Fragment von 2623 Bp. Für cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII siehe H.1.

Die durch Restriktionsspaltungen erhaltenen DNA-Fragmentgrößen stimmten mit den errechneten Fragmentgrößen überein.

E.2.2.1 Konstruktion von pHCI Δ C F195C/G54C

Die Konstruktion von pHCI Δ C F195C/G54C erfolgte -wie unter D.2.4.10.2.5 beschrieben- und gliederte sich in vier Abschnitte:

- Overlap-Extension-PCR-Mutagenese zur Erzeugung eines 613 Bp großen Produktes. Dieses wurde gebildet durch Überlappen und Verlängerung ("overlap-extension") von zwei aufgereinigten, an ihren Enden zueinander komplementären 1. Runde PCR-Mutagenese-Produkten von 189 Bp und 460 Bp. Das entstehende PCR-Produkt der Overlap-Extension-PCR-Mutagenese enthielt die Mutation Gly54 \rightarrow Cys54 und einer Indikatormutation, welche eine *PflMI*-Schnittstelle im Codon für Thr47 entfernte.
- Spaltung des Overlap-Extension-PCR-Mutagenese Produktes von 613 Bp mit *PstI*, Aufreinigung des entstehenden 541 Bp großen Spaltproduktes, anschließende Spaltung mit *AocI* und Aufreinigung des daraus entstehenden 384 Bp großen Spaltproduktes.
- Vorbereitung des Ausgangsvektors pHCI Δ C F195C durch partielle Spaltung mit *PstI*, Aufreinigung des linearisierten partiell gespaltenen Plasmids. Anschließende Spaltung mit *AocI* und Aufreinigung des 6187 Bp großen *AocI-PstI*-Fragments von pHCI Δ C F195C .
- Ligation der aufgereinigten Fragmente zu pHCI Δ C F195C/G54C, Transformation in *E. coli* MC1061/P3 und Charakterisierung isolierter Plasmide.

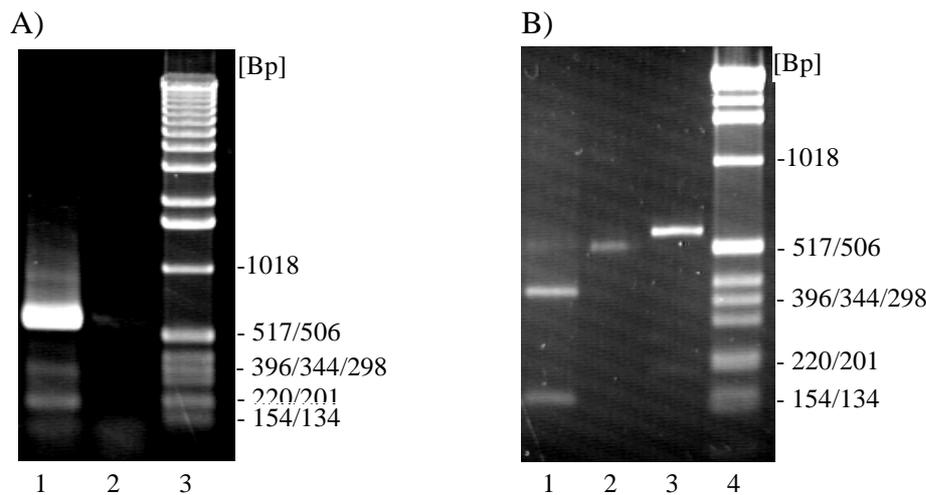


Abbildung 45: A) Overlap-Extension-PCR-Mutagenese zur Erzeugung eines 613 Bp-großen PCR-Mutagenese-Produktes mit der Mutation G54C B) Spaltprodukte des Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produktes.

Gel A): 1% (w/v) Agarose

Spur 1: PCR-Mutagenese-Produkt (613 Bp)

Spur 2: Negativkontrolle

Spur 3: DNA-Längenstandard X

Gel B) 2,5% (w/v) Agarose

Spur 1: PCR-Mutagenese-Produkt *AocI* & *PstI* gespalten (384 Bp)

Spur 2: PCR-Mutagenese-Produkt *PstI* gespalten (541 Bp)

Spur 3: PCR-Mutagenese-Produkt ungespalten (613 Bp)

Spur 4: DNA-Längenstandard X

Abbildung 45 A) zeigt das Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Produkt von 613 Bp, sowie schwach eines der beiden Ausgangs-PCR-Produkte der 1. PCR-Mutageneserunde von 189 Bp (siehe Abschnitt a oben). Teil B) zeigt das ungespaltene PCR-Mutagenese-Produkt von 613 Bp, das *PstI*-gespaltene PCR-Mutagenese-Produkt von 541 Bp, sowie *AocI* & *PstI* geschnittenes PCR-Mutagenese-Produkt von 384 Bp (siehe Abschnitt b oben).

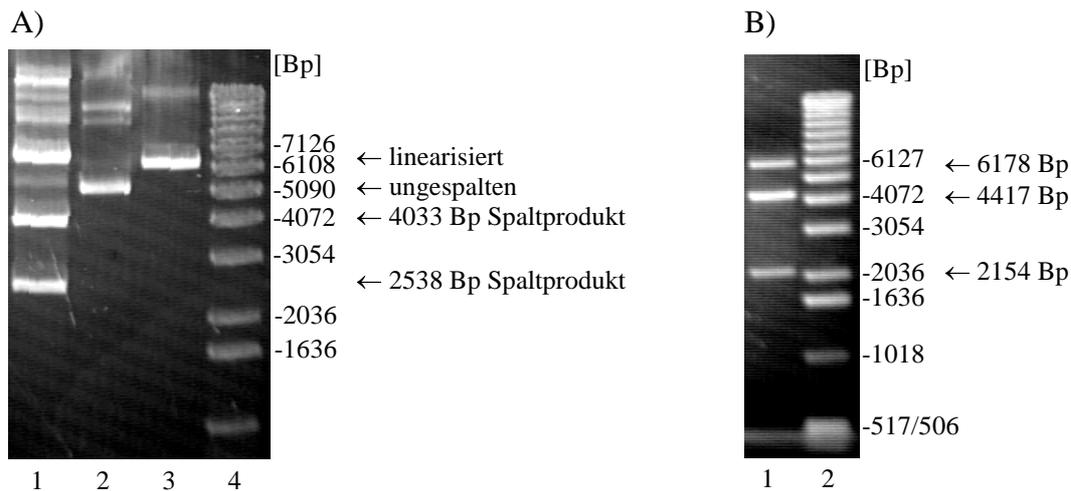


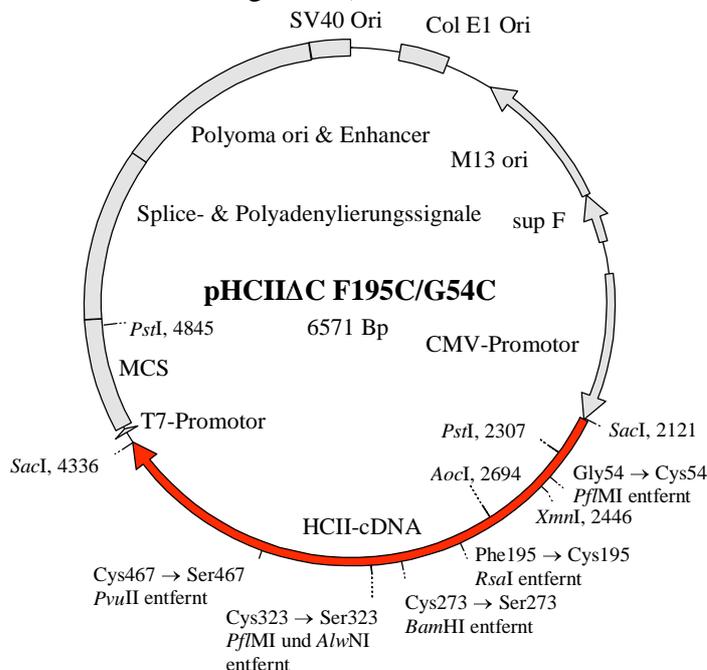
Abbildung 46: A) Partielle Spaltung von pHCIΔC F195C mit *Pst*I; B) Spaltung des *Pst*I- linearisierten pHCIΔC F195C mit *Aoc*I. Beide Gele enthalten 1% (w/v) Agarose.

Spur 1: pHCIΔC F195C partiell *Pst*I gespalten
 Spur 2: pHCIΔC F195C ungespalten
 Spur 3: pHCIΔC F195C linearisiert mit *Sma*I
 Spur 4: DNA-Längenstandard X

Spur 1: *Pst*I linearisiertes pHCIΔC F195C gespalten mit *Aoc*I
 Spur 2: DNA-Längenstandard X

Abbildung 46 A) zeigt die Vorbereitung der Vektors pHCIΔC F195C durch partielle *Pst*I-Spaltung und dabei entstehendes linearisiertes Plasmid (6571 Bp), vollständig gespaltenes Plasmid (2538 und 4033 Bp) sowie einen Rest ungespaltenes Plasmid. Als Kontrollen sind ungespaltenes pHCIΔC F195C und *Sma*I-linearisiertes Plasmid (6571 Bp) aufgetragen.

Teil B) zeigt die *Aoc*I-Spaltung des gereinigten *Pst*I-linearisierten Vektors pHCIΔC F195C (6571 Bp) mit den entstehenden Fragmenten von 2154 Bp und 4417 Bp bzw. 6187 Bp und 384 Bp (384 Bp-Fragment nicht sichtbar), je nachdem welche der beiden *Pst*I-Schnittstellen bei der partiellen *Pst*I-Spaltung gespalten wurde (für beide Teile der Abbildung siehe Abschnitt c, vorherige Seite).



Vektorelemente:

- Col E1 ori: bakterieller Replikationsursprung
- M13 ori: Replikationsursprung des Phagen M13
- supF: amber-Suppressor tRNA Gen
- CMV-Promotor: viraler Promotor aus humanem Cytomegalovirus
- HCII-cDNA: Heparinkofaktor II cDNA
- MCS: multiple cloning site
- Splice- & Polyadenylierungssignale
- Polyoma ori & Enhancer: Replikationsursprung und Enhancer des Polymavirus
- SV40 ori: Replikationsursprung des SV40 Virus
- Für *Alw*NI, *Bam*HI, *Pf*MI, *Pvu*II, *Rsa*I und *Xmn*I sind weitere Schnittstellen vorhanden, jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 47: Aufbau und Elemente von pHCI ΔC F195C/G54C.

Die bei den Schnittstellen angegebene Position stellt jeweils den Beginn der Erkennungsequenz dar.

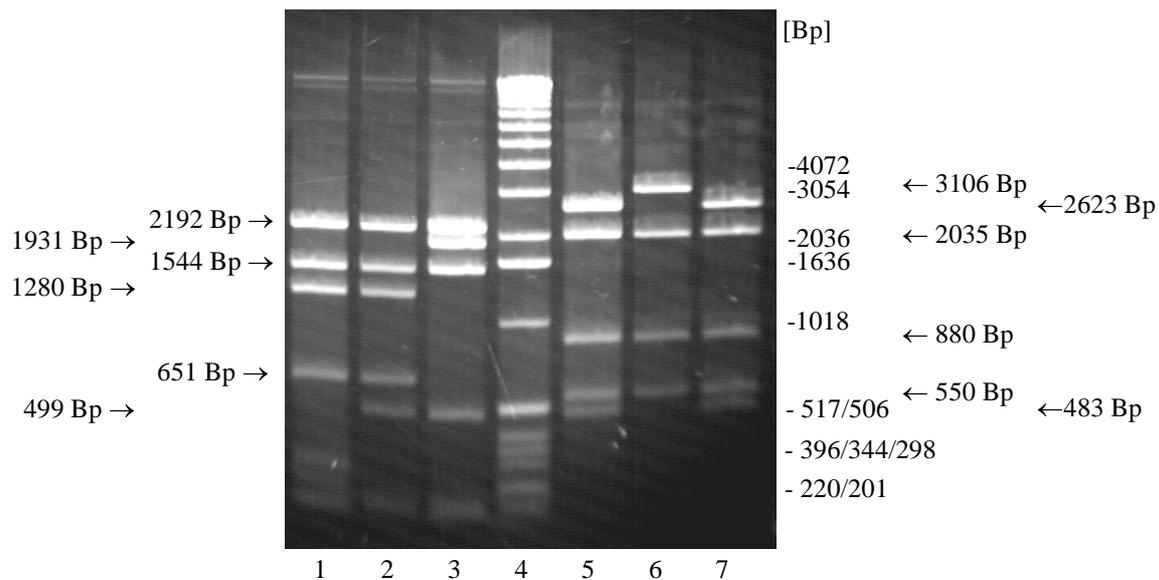


Abbildung 48: Charakterisierende Restriktionsspaltungen von pWTBiI, pHCIΔC F195C/G54C und pHCIΔC F195C/S68C mit *PvuII* & *XmnI* bzw. *NcoI* & *PflMI*. Die zu erwartenden DNA-Fragmentlängen sind in Tabelle 21 dargestellt. Fragmente < 220 Bp sind nicht sichtbar. Agarosekonzentration des Gels: 1% (w/v)

Spur 1: pWTBiI gespalten mit *PvuII* und *XmnI*

Spur 2: pHCIΔC F195C/G54C gespalten mit *PvuII* & *XmnI*

Spur 3: pHCIΔC F195C/S68C gespalten mit *PvuII* & *XmnI*

Spur 4: DNA-Längenstandard X

Spur 5: pWTBiI gespalten mit *NcoI* & *PflMI*

Spur 6: pHCIΔC F195C/G54C gespalten mit *NcoI* & *PflMI*

Spur 7: pHCIΔC F195C/S68C gespalten mit *NcoI* & *PflMI*

Plasmid	Restriktionsendonucleasen und entstehende Fragmentgrößen in Bp	
	<i>PvuII</i> & <i>XmnI</i>	<i>NcoI</i> & <i>PflMI</i>
pWTBiI	134, 134, 137, 220, 279, 651, 1280, 1544, 2192	483, 550, 814*, 880, 1809*, 2035
pHCIΔC F195C/G54C	134, 134, 137, 499, 651, 1280, 1544, 2192	550, 880, 2035, 3106
pHCIΔC F195C/S68C	134, 134, 137, 499, 1544, 1931, 2192	483, 550, 880, 2035, 2623

Tabelle 21: Charakterisierende Restriktionsspaltungen von pWTBiI, pHCIΔC F195C/G54C und pHCIΔC F195C/S68C mit den Enzymkombinationen *PvuII* & *XmnI*, bzw. *NcoI* & *PflMI*.

*: Die *PflMI*-Schnittstelle in pWTBiI bei Position 3208 wird im verwendeten *E. coli* Stamm MC1061/P3 über das *dcm*-System methyliert. Die beiden mit "*" gekennzeichneten Fragmente werden aufgrund der Modifikation der Erkennungssequenz nicht durch *PflMI* gespalten und bilden zusammen ein Fragment von 2623 Bp.

Für cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII siehe H.1

Abbildung 48 zeigt die charakterisierenden Restriktionsspaltungen von pWTBiI, pHCIΔC F195C/G54C und pHCIΔC F195C/S68C mit *PvuII* & *XmnI* bzw. *NcoI* & *PflMI*. Die entstehenden Fragmentgrößen sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß pHCIΔC F195C/G54C und pHCIΔC F195C/S68C durch die eingeführten Indikatormutationen die erwarteten geänderten Restriktionsschnittmuster gegenüber pWTBiI aufweisen. Da der Austausch der Codons für die zu mutierenden Aminosäurepositionen jeweils über den selben Primer erfolgte, der auch die Indikatormutation einführte, ist dies ein starker Hinweis dafür, daß gleichzeitig mit der Indikatormutation auch das jeweils gewünschte Aminosäurecodierende Codon mutiert wurde. Die Kontrolle hierfür erfolgte über die Sequenzierung der cDNAs (siehe E.3).

pWTBiI	TGCCTTGGGGGCACCCCTATTTTGTTCATTCCAACAACGAGAACAGAGATGTTCTGGC
pHCIIΔC	TGCCTTGGGGGCACCCCTATTTTGTTCATT
pHCIIΔC F195C	TGCCTTGGGGGCMCC-TCATTTTGTTCAT
pHCIIΔC F195C/P52C	TGCCTTGGGGGCACCCCTATTTTGTTCATTCCAACAACGAGAACAGAGATGTTCTGGC
pHCIIΔC F195C/G54C	TGCCTTGGGGGCACCCCTATTTTGTTCATTCCAACAACGAGAACAGAGATGTTCTGGC
pHCIIΔC F195C/S68C	TGCCTTGGGGGCACCCCTATTTTGTTCATT
pWTBiI	ATCATTTACGTAGTTTACGCTACCAATCTGAATTCGAGGCCCATATGAGAGGAGCTTAGA
pHCIIΔC F195C/G54C	ATCATTTACGTAGTTTACGCTACCAATCTGAATTCGAGGCCCATATGAGAGGAGCTTAGA
pWTBiI	AACGACCAAGAAGAGAGGGCTTGTGGAATCAATTCTGCACAATAGCCCATGCTGTAAGCT
pHCIIΔC F195C/G54C	AACGACCAAGAA
pWTBiI	CATAGAAGTCACTGTAACCTGTAGTGTGTCTGCTGTTACCTAGAGGGTCTCACCTCCCCAC
pWTBiI	TCTTCACAGCAAACCTGAGCAGCGCTCCTAAGCACCTCCCGCTCCGGTGACCCCATCCT
pWTBiI	TGCACACCTGACTCTGTCACTCAAGCCTTTCTCCACCAGGCCCTCATCTGAATACCAAG
pWTBiI	CACAGAAATGAGTGGTGTGACTAATTCCTTACCTCTCCCAAGGAGGGTACACAACCTAGCA
pWTBiI	CCATTCTTGATGTCCAGGGAAGAAGCCACCTCAAGACATATGAGGGGTGCCCTGGGCTAA
pWTBiI	TGTTAGGGCTTAATTTTCTCAAAGCCTGACCTTCAAATCCATGATGAATGCCATCAGTC
pWTBiI	CCTCCTGCTGTTGCCTCCCTGTGACCTGGAGGACAGTGTGTGCCATGTCTCCCATACTAG
pWTBiI	AGATAAATAAATGC GAGCTC <u>TCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGA</u>
pWTBiI	<u>AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTTCTAGAGATCCTCGACCTCGAGATCTT</u>
pWTBiI	<u>GTGCTGGCGCGGATTCTTTTATCACTGATAAGTTGGTGGACATATTATGTTTATCAGTGAT</u>
pWTBiI	<u>AAAGTGTCAAGCATGASAAAGTTGCAGCCGAATACAGTGATCCGTGCGGCCTGGACCTCT</u>
pWTBiI	<u>GTTGAACGAGGTGCGGTARAGGTCTGACGAAAGCAA</u>

Tabelle 22: Ergebnisse der durchgeführten Plasmidsequenzierungen.

blau: Restriktionsendonucleaseschnittstellen, über welche die cDNA bzw. cDNA-Fragmente im Vektor eingesetzt, bzw. ausgetauscht wurden. Für cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII siehe H.1.

grün: intakte Restriktionsendonucleaseschnittstelle; **grün-rot:** zerstörte Restriktionsendonucleaseschnittstelle, **rot:** neues Codon in HCII-cDNA.

K= T/G, R = A/G, M= A/C, S= C/G,

Die durchgeführten Sequenzierungen zeigten, daß die komplette HCII-cDNA-Sequenz von pWTBiI mit der von Ragg¹ veröffentlichten Sequenz (siehe H.1) übereinstimmt. Bei den Expressionsplasmiden pHCIIΔC, pHCIIΔC F195C, pHCIIΔC F195C/P52C, pHCIIΔC F195C/G54C und pHCIIΔC F195C/S68C wurde der für das HCII-Protein kodierende Bereich der cDNAs komplett sequenziert. Alle Varianten zeigten nur die gezielt eingeführten Mutationen mit den Codons für die gewünschten Aminosäuresequenzen.

Bei den Expressionsplasmiden pHCII C273S/C323S und pHCII F195C wurden nur die neu eingefügten cDNA Bereiche inklusive der dafür verwendeten Schnittstellen sequenziert. Bei den beiden Plasmiden pSBR3 und pSBR4 wurde das Insert partiell zur Überprüfung der eingeführten Mutationen sequenziert. Die erhaltenen Daten zeigten die erwarteten Sequenzen.

Bei pHCIIΔC und pHCIIΔC F195C/S68C wiesen die Sequenzierreaktionen vor dem Codon für Gly1 des reifen Proteins vier "K" (K=T/G) auf. Dieser Bereich war bei allen durchgeführten Sequenzierungen sehr schwer zu lesen, da er offensichtlich zur Ausbildung

¹ Ragg 1986

von DNA-Sekundärstrukturen, sog. Kompressionen neigt. Bei pHCIAC F195C/S68C kodieren beide möglichen Codons für Glycin. Bei pHCIAC ist festzustellen, daß sowohl beim Ausgangsplasmid pWTBiI, als auch bei dem aus pHCIAC hervorgegangenen pHCIAC F195C die korrekte Sequenz gelesen wurde. Ebenso traten hinter dem Stop-Codon und im Bereich der pCDM8-Vektorsequenz, die im Anschluß an die HCII-cDNA folgt, einige nicht sicher bestimmte Basen auf. Auf eine Wiederholung der hierfür durchgeführten Sequenzierungen wurde verzichtet, da das Ziel der Sequenzierungen die Überprüfung des für HCII kodierenden Bereiches der cDNA war, um eine korrekte Aminosäuresequenz der exprimierten HCII-Varianten zu gewährleisten.

E.4 Produktion von rekombinantem HCII

Die Produktion der rekombinanten HCII-Varianten erfolgte in FCS-freiem Medium, da FCS Rinder-HCII enthält. Rinder-HCII ließe sich bei den Affinitätschromatographischen Reinigungen (siehe D.2.5.2) vermutlich sehr schlecht vom humanen HCII trennen. Zudem hatte sich in Vorversuchen gezeigt, daß Rinder-HCII bei längerer Belichtung in der Chemilumineszenz-Immundetektion (siehe D.2.5.11), wenn auch nur in geringem Maße, von den verwendeten Antikörpern erkannt wird (Ergebnisse nicht dargestellt). Auf die Zugabe von BSA zum Medium als "Schutzprotein" wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß BSA bei längerer Belichtung in der Chemilumineszenz-Immundetektion unspezifische Signale erzeugt (Ergebnisse ebenfalls nicht dargestellt).

HCII-Variante	Wildtypamino­säuren bzw. geänderte Aminosäuresequenzen der HCII-Varianten
Wildtyp-HCII	P52, G54, S68, F195, C273, C323, C467
HCII F195C	P52, G54, S68, F195C , C273, C323, C467
HCIIAC	P52, G54, S68, F195, C273S, C323S, C467S
HCIIAC F195C	P52, G54, S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIAC F195C/P52C	P52C , G54, S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIAC F195C/G54C	P52, G54C , S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIAC F195C/S68C	P52, G54, S68C , F195C, C273S, C323S, C467S

Tabelle 23: Merkmale der untersuchten HCII-Varianten. Der jeweils zuerst angegebene Buchstabe kennzeichnet die Ursprungamino­säure, die Zahl die Aminosäureposition im reifen HCII und der 2. Buchstabe, sofern vorhanden, die neu eingeführte Aminosäure. (Beispiel: **F195C**: Phe195 mutiert zu Cys195) (siehe auch H.1)

E.4.1 Produktion von rekombinantem HCII in COS 7-Zellen nach transienter Lipofektion

Die Lipofektion von COS7-Zellen erfolgte mit Hilfe des Lipofectamin Plus Kits, wie unter Abschnitt D.2.2.7.1 beschrieben. Mit Hilfe des Plasmids pCMV β , welches eine β -Galaktosidase-Expressionskassette enthält, konnte in Vorversuchen zur Etablierung der Methode gezeigt werden, daß >80% der adhären­ten Zellen einer Zellkulturschale mit Hilfe des Kits transfiziert werden können (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Produktion von rekombinantem HCII erfolgte für drei Tage in DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans-Medium (siehe D.2.2.1) in Zellkulturschalen mit einer Kultivierungsfläche von 8,8 cm². Die Zellen wurden hierbei, wie beschrieben, mit 3 ml Zellkulturmedium überschichtet. Mit dieser Methode konnten HCII-Ausbeuten von bis zu 3,7 μ g/ml Zellkulturüberstand erreicht werden, wobei in den meisten Fällen die Konzentration zwischen 0,7 und 2,0 μ g/ml lag.

Fast alle Lipofektionsexperimente wurden mit jeweils einer Plasmidcharge durchgeführt, die jeweils in großem Maßstab hergestellt und aliquotiert worden war. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß die produzierten HCII-Mengen mit zunehmendem Alter der Plasmidisolate und damit verbundenem mehrfachen Auftauen und Einfrieren der Aliquots,

immer geringer wurde. Die höchsten produzierten HCII-Konzentrationen wurden mit frischem Plasmidmaterial erzielt. Zum Ende der Arbeit konnten nur noch HCII-Konzentrationen von maximal 1,5 µg/ml erreicht werden.

E.4.2 Produktion von rekombinatem HCII in COS7-Zellen nach Elektroporation

Die Elektroporation von COS7-Zellen erfolgte wie unter Abschnitt D.2.2.7.2 beschrieben. Die in der Literatur mehrfach beschriebene optimale Spannung von 260 V für die Elektroporation von COS-Zellen¹ wurde ohne weitere Experimente übernommen. In Vorversuchen zur Etablierung der Methode wurden mit dem Plasmid pCMVβ verschiedene Kondensatorkapazitäten getestet. Eine hohe Kapazität von 960µF führte zu einem hohen prozentualen Anteil transfizierter Zellen (>80%), jedoch überlebten weniger als 10% der Zellen die Behandlung. Bei einer niedrigeren Kapazität von 500 µF war die Überlebensrate mit ca. 30-50% zwar deutlich höher, allerdings lag die Transfektionseffizienz nur bei ca. 30-40%. Die letztendlich routinemäßig verwendete Kapazität von 900 µF bewirkte eine Überlebensrate von ca. 20% bei einer Transfektionseffizienz von ca. 60-80%. Um eine höherer Zelldichte nach der Transfektion zu erhalten, wurden die Zellen von zwei bis drei T175-Zellkulturflaschen für die Elektroporation gepoolt. Für die Elektroporationen wurden steigende DNA-Mengen bis zu 50 µg für die Elektroporation der gepoolten Zellen eingesetzt, wobei die Transfektionseffizienz -wie von Blasey *et al.*² beschrieben- bis zu einer DNA-Menge von 40 µg deutlich anstieg. Für die Transfektionen zur Produktion von rekombinatem HCII wurden 40 – 50 µg Plasmid-DNA bei einer Spannung von 260 V und einer Kondensatorkapazität von 900 µF verwendet. Die Zellen wurden ab dem 2. Tag nach der Elektroporation für 6 Tage mit 50 ml DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans Medium (siehe D.2.2.1) kultiviert, wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wurde. In den ersten beiden Tagen produzierten die Zellen zwischen 1,3 µg/ml und 3,0 µg/ml HCII je ml Zellkulturüberstand. Am 3. und 4. Tag bzw. am 5. und 6. Tag nach der Transfektion sank die Produktion auf 0,4µg/ml bis 0,7 µg/ml je ml Zellkulturüberstand. Die Messung der HCII-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA (siehe D.2.5.1).

E.4.3 Etablierung einer rekombinanten CHO DUKX B1 Zelllinie und Produktion von rekombinatem HCIIΔC F195C/P52C

CHO DUKX B1-Zellen wurden -wie unter D.2.2.8.1 beschrieben- mittels Lipofektion mit linearisiertem pSBR21-Plasmid transfiziert (pSBR21 enthält die cDNA für die HCII-Variante HCIIΔC F195C/P52C (siehe D.2.4.10.3)) und ab dem zweiten Tag nach der Transfektion mit G418-haltigem Medium kultiviert. Während die nicht transfizierten CHO DUKX B1-Zellen der Kontrolle binnen einer Woche abstarben, teilten sich die, mit pSBR21 transfizierten Zellen weiter. Zur Überprüfung der HCII-Produktion wurde anschließend eine zu ca. 90% konfluent mit transfizierten CHO DUKX B1 Zellen bewachsene T175-Zellkulturflasche mit 60 ml ProCHO4-CDM-Medium (siehe D.2.2.1) überschichtet und für 3 Tage kultiviert. Der Zellpool produzierte innerhalb dieser Zeit 2,8 µg/ml HCII. Die Bestimmung der HCII-Konzentration erfolgte mittels ELISA (siehe D.2.5.1).

Nach der Isolation von Einzelzellklonen wurde erneut die HCII-Produktion bestimmt. Die Zellen wurden hierfür bei einer Konfluenz von ca. 90% in Zellkulturschalen mit einer Kultivierungsfläche von 21,5 cm² mit 7 ml ProCHO4-CDM-Medium überschichtet und für drei Tage kultiviert. Die durch ELISA ermittelten HCII-Konzentrationen im Zellkulturüberstand sind in Tabelle 24 dargestellt.

¹ Blasey *et al.* 1996, Baum *et al.* 1994, <http://www.bio-rad.com>

² Blasey *et al.* 1996

Klon Nr	HCII-Konz.						
1	0,40	6	0,52	11	0,77	16	2,11
2	0,30	7	0,95	12	1,41	17	0,74
3	0,31	8	1,01	13	1,50	18	1,60
4	0,48	9	0,60	14	1,33	19	3,22
5	0,44	10	0,72	15	2,10		

Tabelle 24: HCII-Produktion (in µg/ml) im Zellkulturüberstand der untersuchten Einzelzellklone

Wie aus Tabelle 24 hervorgeht produzierten die Klone Nr. 15, Nr 16 und Nr.19 die größten Mengen an HCII. Klon Nr. 19 wurde anschließend für die HCIIΔC F195C/P52C-Produktion weiterverwendet.

Obwohl mit ProCHO4-CDM-Medium deutlich höhere HCII-Produktionsraten erzielt werden konnten als mit DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans, wurde letztendlich auf ProCHO4-CDM-Medium verzichtet. Der Grund hierfür lag in der Tatsache, daß anscheinend immer sehr geringe Mengen der reduzierten Form der Varianten entstanden. Der Anteil dieser reduzierten Form war bei Verwendung von ProCHO4-CDM-Medium klar am größten (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Hersteller macht zudem keine Angaben über die Zusammensetzung des Mediums. Der geringe Anteil der reduzierten Form von HCIIΔC F195C/P52C stellte bei der chromatographischen Reinigung über Heparin-Sepharose ein großes Problem dar, da die reduzierte Form mit höherer Affinität an die Säulenmatrix band als die oxidierte Form (siehe hierzu E.6). Beim Auftrag von bis zu 1,2 Liter Zellüberstand auf die Säule wurden ca. 50% der oxidierten Form aufgrund der geringeren Affinität bereits beim Auftrag wieder heruntergewaschen, während der reduzierte Anteil aufgrund der höheren Affinität fast vollständig gebunden blieb. Dies führte zu einer Anreicherung der reduzierten Form, wie in Abbildung 49 dargestellt.

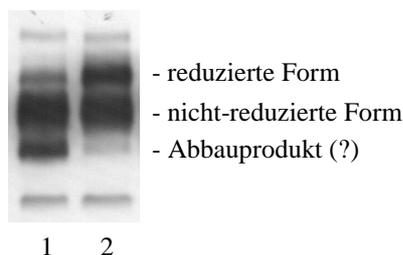


Abbildung 49: HCIIΔC F195C/P52C aus CHO DUKX B1-Zellen, kultiviert mit ProCHO4-CDM-Medium nach Elution mit linearem NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl) (siehe D.2.5.2.1) von einer FPLC-Heparin-Sepharose-Säule. Spur 1) Fraktionen 5 u. 6 gepoolt (50-150 mM NaCl), Spur 2) Fraktion 7 (150-200 mM NaCl)

Bei der HCII-Produktion in T175-Zellkulturflaschen mit DMEM & Pen/Strep & Ins/Trans Medium, dem 0,7 mg/l Thymidin zugesetzt wurde, konnten binnen vier Tagen bis zu 0,97 µg/ml HCIIΔC F195C/P52C in einem Kulturvolumen von 100 ml produziert werden. Die in der AG zelluläre Gemetik vorhandene stabil transfizierte CHO DUKX B1-Zelllinie¹, welche Wildtyp-HCII produziert, produzierte unter denselben Bedingungen eine HCII-Konzentration bis zu 3,8 µg/ml im Kulturüberstand.

Probenahmezeitpunkt [Std nach Versuchsbeginn]	Gesamt-HCII [µg/ml]	neu produziertes HCII [µg/ml]	spezifische Produktivität [µg HCII/(10 ⁶ Zellen*Tag)]
32	0,28	0,28	0,54
48	0,36	0,08	0,41
72	0,50	0,14	0,36
96	0,97	0,47	1,21
Spezifische Produktivität über den gesamten Kultivierungsverlauf			0,63

Tabelle 25: Bestimmung der spezifischen Produktivitäten von HCIIΔC F195C/P52C in CHO DUKX B1 Zellen.

¹ Böhme 2001

Für die Produktion von HCIIΔC F195C/P52C wurde in einem Experiment die spezifische Produktivität über den viertägigen Kultivierungsverlauf bei einem Kulturvolumen von 100 ml bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl ($3,87 \cdot 10^7$ Zellen je T175-Flasche) erfolgte nach Abschluß des Experimentes durch Trypanblau-Ausschlußfärbung (siehe D.2.2.3). Dies stellt keine Verzerrung der Ergebnisse dar, da die Zellen über den Versuchsverlauf kein erkennbares Wachstum zeigten und nur wenige Zellen abstarben. Tabelle 25 zeigt die ermittelten spezifischen Produktivitäten je 10^6 Zellen und Tag. Es fällt auf, daß die größte spez. Produktivität erst am Ende der Kultivierung erreicht wird.

Für die Produktion von Wildtyp-HCII in stabil transfizierten CHO DUKX B1-Zellen wurde die spezifische Produktivität über den Gesamtverlauf der Produktionsphase bestimmt. Sie betrug $1,93 \mu\text{g}$ HCII je Tag und 10^6 Zellen und ist damit etwa dreimal so hoch wie bei der Produktion von HCIIΔC F195C/P52C.

E.5 Nachweis des rekombinant hergestellten HCII

Die Identität des rekombinanten HCII wurde durch Immunreaktion mit zwei monoklonalen Anti-HCII-Antikörpern im ELISA (siehe D.2.5.1), sowie durch ein polyklonales Antiserum in der Chemilumineszenz-Immudetektion (siehe D.2.5.11) nachgewiesen. Verschiedene NaCl-Konzentrationen, die Präsenz von bis zu 1,5 mM DTT und die Modifikation von HCII durch Alkylierung hatten, wie bereits unter D.2.5.1 beschrieben, keinen oder nur geringen Einfluß auf die erhaltenen ELISA-Messwerte.

Die biologische Aktivität der verschiedenen rekombinanten HCII-Varianten konnte durch Reaktion mit humanem Thrombin (siehe E.10) und anschließende Chemilumineszenz-Immudetektion der dabei entstehenden SDS-stabilen HCII/Thrombinkomplexe gezeigt werden. Zudem wurden für HCIIΔC F195C/P52C und Wildtyp-HCII Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die Reaktion mit Humanthrombin bestimmt (siehe E.15).

Die Ermittlung des apparenten Molekulargewichts der rekombinanten HCII-Varianten mit Hilfe von Proteingrößenmarkern (siehe D.1.6) und der Software WinCam V2.2. (siehe D.1.13) ergab Werte von ca. 73 kDa bis 79 kDa (je nach Gellauf und verwendeten Molekulargewichtsmarkern) für die rekombinanten HCII-Varianten sowohl aus COS7- als auch aus CHO DUKX B1-Zellen. Die Werte stimmen mit den Literaturdaten überein. Obwohl die molekulare Masse von Plasma-HCII 65,6 kDa beträgt¹ (die Ermittlung erfolgte anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit bei analytischer Ultrazentrifugation), werden für das Glykoprotein HCII in der SDS-PAGE apparente Molekulargewichte zwischen 66 kDa und 78 kDa erhalten, abhängig von den verwendeten Elektrophoresebedingungen².

Die apparenten Molekulargewichte für HCII-Thrombinkomplexe lagen bei ca. 102 kDa, was etwa der Summe aus dem ermittelten apparenten Molekulargewicht von HCII und dem Molekulargewicht der B-Kette von Thrombin entspricht. Die 49 Aminosäuren lange A-Kette des Thrombins, welche über eine Disulfidbrücke an die B-Kette gebunden ist, wird durch den reduzierenden Probenpuffer abgespalten.

Anmerkung:

Beide zum Nachweis von HCII verwendeten monoklonalen ELISA-Antikörper binden am N-terminalen Ende des Moleküls vor Aminosäure Asp124. Diese Erkenntnis wurde zufällig durch die unfreiwillige Verwendung eines Expressionsplasmides gewonnen, bei dem eine Rastermutation im Codon für Aminosäure Asp124 aufgetreten war, welche an Aminosäureposition 133 ein Stop-Codon erzeugte. Die von diesem Plasmid codierten HCII-Fragmente wurden im ELISA problemlos erkannt (Ergebnisse nicht dargestellt).

¹ Tollefsen *et al.* 1982

² Tollefsen *et al.* 1982; Tollefsen *et al.* 1983; Griffith *et al.* 1985 a & b, Pratt *et al.* 1989;

E.6 Partielle Reinigung von HCII mit Heparin-Sepharose

E.6.1 Partielle Reinigung von HCII aus COS7-Zellen mittels linearem NaCl-Gradienten

20 bis 140 ml Zellkulturüberstände aus der Elektroporation von COS7-Zellen wurden -wie unter D.2.5.2.1 beschrieben- unter nicht reduzierenden (ohne DTT-Zugabe) oder reduzierenden Bedingungen (3 mM DTT) auf eine FPLC-Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen und mittels eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl (mit bzw. ohne 3 mM DTT) von der Säule eluiert und in 20 Fraktionen à 2 ml aufgefangen.

Folgende HCII-Varianten wurden partiell aufgereinigt:

- Wildtyp-HCII
- HCIIΔC F195C/P52C
- HCIIΔC F195C/G54C
- HCIIΔC F195C/S68C

Tabelle 26 zeigt den prozentualen Anteil der eluierten HCII-Varianten unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Fraktion mit der höchsten HCII-Konzentration ist dabei farblich hervorgehoben. Im Durchlauf aller HCII-Varianten wurden maximal 15% des aufgetragenen HCII detektiert, in den Waschfraktionen nur HCII-Mengen unter 0,06 µg/ml.

Fraktion	Wildtyp-HCII		HCIIΔC F195C/P52C		HCIIΔC F195C/G54C		HCIIΔC F195C/S68C	
	ohne DTT	mit DTT	ohne DTT	mit DTT	ohne DTT	mit DTT	ohne DTT	mit DTT
F4 (Ø 25 mM) 0 - 50 mM	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
F5 (Ø 75 mM) 50 - 100 mM	0 %	0,7 %	24%	0 %	19 %	0 %	9 %	1 %*
F6 (Ø 125mM) 100 - 150 mM	3 %	3 %*	47 %	6 %*	35 %	0%	27 %	0 %
F7 (Ø 175 mM) 150 - 200 mM	17 %	8 %	12 %	11 %	15 %	11 %	16%	14 %
F8 (Ø 225 mM) 200 - 250 mM	34 %	39 %	6 %	37 %	8 %	30 %	12%	22 %
F9 (Ø 275 mM) 250 - 300 mM	19 %	24 %	5 %	18 %	6 %	24 %	11 %	15 %
F10 (Ø 325 mM) 300 - 350 mM	10 %	7 %	4 %	9 %	6 %	13 %	8%	12 %
F11 (Ø 375 mM) 350 - 400 mM	10 %	7 %	3 %	8 %	5 %	13 %	7 %	15 %
F12 (Ø 425 mM) 400 - 450 mM	7 %	4 %*	n.b.	6 %	4 %	4 %*	5 %	13 %
F13 (Ø 475 mM) 450 – 500 mM	n.b.	7 %*	n.b.	5%	2 %	5 %*	4 %	8 %*
eingesetzte HCII-Menge	32,2 µg in 140 ml	11,5 µg in 50 ml	230,0 µg in 100 ml	46,0 µg in 20 ml	19,8 µg in 100 ml	7,9 µg in 40 ml	37,0 µg in 140 ml	13,2 µg in 50 ml
Ausbeute F4 – F13 gegenüber Auftragsmenge	10,6 µg entspricht 33 %	2,9 µg entspricht 25 %	62,5 µg entspricht 27%	8,4 µg entspr. 18 %	6,5 µg entspricht 33 %	3,3 µg entspricht 42 %	12,9 µg entspricht 35 %	3,4 µg entspricht 26 %

Tabelle 26: Elutionsverhalten der untersuchten HCII-Varianten von der FPLC-Heparin-Sepharose-Säule bei linear steigender NaCl-Konzentration (0 – 1 M NaCl) unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen. Angegeben ist jeweils die Fraktionsnummer, die mittlere NaCl-Konzentration der Fraktion(Ø), sowie der NaCl-Konzentrationsbereich über den sich die Fraktion erstreckt. Die angegebenen Prozentwerte geben den jeweiligen Anteil des HCII in der jeweiligen Fraktion gemessen am Gesamt-HCII der untersuchten Fraktionen wieder. (Rundungsbedingt können Gesamtprozentzahlen ≠ 100 % entstehen.)

* : gemessene ELISA-Werte im Bereich der Nachweisgrenze. n.b. : nicht bestimmt

Wie aus Tabelle 26 zu ersehen ist, hatte das Vorhandensein oder Fehlen von DTT keinen Einfluß auf das Elutionsverhalten von Wildtyp-HCII von der Heparin-Sepharose-Säule. Der prozentual größte Anteil von HCII eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 200 bis 250 mM NaCl. Der Wert stimmt sowohl mit Messwerten überein, die innerhalb der AG zelluläre Genetik mit Plasma-HCII erzielt wurden¹ (210 mM), als auch mit Literaturdaten², die je nach Wahl der Versuchsbedingungen und der Heparinmatrix zwischen 0,15 und 0,4 M NaCl liegen. Alle drei HCII-Varianten mit einer Disulfidbrücke (für den Nachweis der Disulfidbrücken siehe E.7) zeigten deutliche Unterschiede in ihrem Elutionsverhalten in Abhängigkeit von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von DTT. Ohne DTT, das heißt bei geschlossener Disulfidbrücke, eluierten die drei Varianten bei einer ca. 100 mM geringeren NaCl-Konzentration von der Säule, als bei geöffneter Disulfidbrücke. Die Reduktion der Disulfidbrücke überführte die drei Proteinvarianten in eine Form, die sich in ihrem Elutionsverhalten ebenso verhielt wie Wildtyp-HCII. Die geschlossenen Disulfidbrücken bewirkten somit eine Änderung der Affinität zu Heparin-Sepharose. Übereinstimmend mit dem Modell der HCII-Aktivierung durch GAGs erscheint es vorstellbar, daß der fixierte saure Aminoterminus von HCII die GAG-Bindestelle zumindest partiell abschirmt und die Bindung an Heparin-Sepharose sterisch behindert, was sich im veränderten Elutionsverhalten manifestiert. Nach Reduktion verhalten sich die drei Proteinvarianten wieder wie Wildtyp-HCII, das heißt, Heparin kann wieder an die GAG-Bindestelle unter Verdrängung des sauren N-Terminus binden, was zu einer erhöhten Affinität gegenüber Heparin-Sepharose führt.

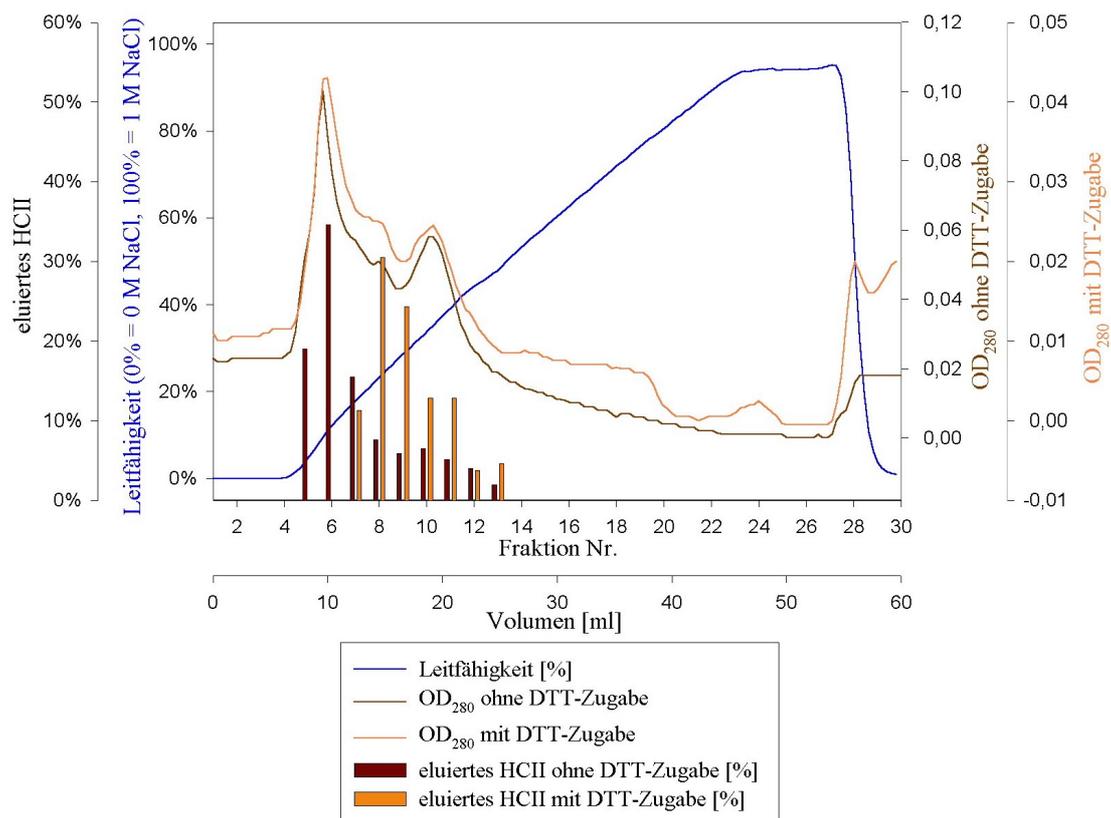


Abbildung 50: FPLC-Elutionsdiagramme von HCIIΔC F195C/G54C unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen, sowie die prozentualen Anteile an HCII in den jeweiligen Fraktionen.

Abbildung 50 zeigt beispielhaft die FPLC-Elutionsdiagramme von HCIIΔC F195C/G54C unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen, sowie die prozentualen Anteile an HCII in den jeweiligen Fraktionen.

¹ Böhme 2001

² Tollefsen *et al.* 1982, Ragg *et al.* 1990 a, Pratt *et al.* 1992, Gettins *et al.* 1996, Liaw *et al.* 1999

Die FPLC-Fractionen wurden im Western-Blot (siehe D.2.5.10) unter nicht reduzierenden Bedingungen auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von Disulfidbrücken im HCII untersucht, sowie die biologische Aktivität des enthaltenen HCII durch Komplexbildung mit Thrombin (siehe D.2.5.8) überprüft (nicht abgebildet).

Die Ausbeuten der durchgeführten Aufreinigungen, sowohl mit als auch ohne DTT Zugabe, lagen, wie aus Tabelle 26 zu ersehen ist, zwischen 18 und 35 % des eingesetzten Materials. Anhand der ermittelten ELISA-Meßwerte kann allerdings keine Aussage gemacht werden, an welcher Stelle der Großteil des HCII verloren ging. Ein gewisser Anteil ging vermutlich während des Waschens der Säule mit meist 5 bis 6 Säulenvolumen verloren. Bei späteren Vorversuchen zur Reinigung von HCII Δ C F195C/P52C aus CHO DUKX B1-Zellen war aufgefallen, daß zu Beginn des Waschschrittes, dem eine Reinigen der Pumpen vorausging, ein kurzer hoher Peak mit viel HCII von der Säule eluierte. Möglicherweise ging hier ein großer Teil an HCII verloren.

E.6.2 Partielle Reinigung von HCII aus CHO DUKX B1 Zellen mittels NaCl-Stufengradienten

Für die partielle Reinigung der reduzierten und alkylierten, oder der unbehandelten Form von Wildtyp-HCII bzw. HCII Δ C F195C/P52C wurde ein NaCl-Stufengradient mit Stufen von 0, 100, 300 und 1000 mM NaCl -wie unter D.2.5.2.2 beschrieben- verwendet. Die Vorschaltung einer NaCl-Stufe mit 100 mM NaCl ermöglichte es, eine höhere Reinheit der oxidierten Form von HCII Δ C F195C/P52C zu erhalten und einen geringeren Anteil eines vermutlichen HCII-Abbauproduktes. Auf der 100 mM-Stufe eluierte neben einem Teil des oxidierten HCII Δ C F195C/P52C, das damit verloren ging, eine zweite Bande mit einer Größe von ca. 55 kDa, die ebenfalls von den verwendeten Anti-HCII-Antikörpern erkannt wurde (siehe auch Abbildung 49, Seite 129). Die Vermutung liegt nahe, daß es sich hierbei um ein Abbauprodukt von HCII handelt. Der Anteil dieser Bande erreichte ca. 30% am HCII der 100 mM NaCl-Fractionen. In den Fraktionen der 300 mM-Stufe betrug er deutlich weniger als 10%.

Bei der Produktion von HCII-Varianten mit zwei neu eingeführten Cysteinen entstand, wie bereits erwähnt, auch ein sehr geringer Anteil von HCII mit geöffneter Disulfidbrücke. Da diese Variante -wie unter E.6.1 beschrieben- eine höhere Affinität zu Heparin-Sepharose hat, wurde sie bei der Chromatographie angereichert. Für die affinitätschromatographische Reinigung der oxidierten Form mit geschlossenen Disulfidbrücke wurden bis zu 1,2 Liter Zellkulturüberstand auf die Säule gegeben. Dies bedingte, daß ca. 50% des aufgetragenen HCII Δ C F195C/P52C schon während des Auftrags aufgrund der geringen Affinität wieder heruntergewaschen wurden. Die HCII-Moleküle mit geöffneter Disulfidbrücke blieben dabei aufgrund ihrer höheren Affinität zur Heparin-Sepharose besser am Säulenmaterial haften. Der Anteil der reduzierten HCII Δ C F195C/P52C-Form in den Fraktionen der 300 mM NaCl-Stufe war jedoch immer noch sehr gering (siehe Abbildung 51, zum Vergleich siehe auch Abbildung 49 Seite 129). Eine densitometrische Auswertung lieferte aufgrund des unspezifischen grauen Hintergrundes zwischen den Banden keine verwertbaren Daten.

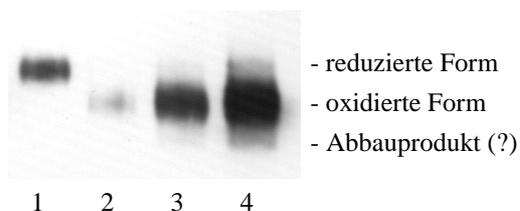


Abbildung 51: Western-Blot-Analyse von verschiedenen Mengen von partiell gereinigtem HCII Δ C F195C/P52C der 300 mM NaCl-Stufe nach SDS-PAGE mit nicht reduzierendem Probenpuffer.

Spur 1: reduziertes und alkyliertes HCII Δ C F195C/P52C (Kontrolle); Spuren 2 – 4 : 0,75 / 5 / 10 μ l nicht reduziert HCII Δ C F195C/ P52C

Die Verwendung der 100 mM NaCl-Stufe bedingte einen Verlust von ca. 20% des nach dem Auftrag an die Säule gebundenen HCII Δ C F195C/P52C mit geschlossener Disulfidbrücke. Wildtyp-HCII sowie die reduzierte und alkylierte Form von HCII Δ C F195C/P52C eluierten bei 100 mM NaCl nur in Spuren.

Das Problem der Akkumulation der reduzierten Form bei der partiellen Aufreinigung der HCII-Varianten mit Disulfidbrücke war mit COS-Zellmaterial und bei Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten nicht aufgetreten.

E.7 Nachweis der neu ins HCII eingeführten Disulfidbrücken

Nachdem das unterschiedliche Elutionsverhalten der drei HCII-Varianten mit je zwei neu eingeführten Cysteinresten mit- bzw. ohne DTT-Zugabe von der FPLC-Heparin-Sepharose-säule im Vergleich zu Wildtyp-HCII einen ersten Hinweis auf das mögliche Vorhandensein von Disulfidbrücken gegeben hat, sollte der Beweis mittels zweier unabhängiger Methoden erbracht werden.

E.7.1 Unterschiedliche Mobilität der Varianten unter nicht reduzierenden Bedingungen

Die Präsenz von Disulfidbrücken in Proteinen läßt sich -wie bereits unter D.2.5.9 beschrieben- durch SDS-PAGE unter reduzierenden, bzw. nicht reduzierenden Bedingungen nachweisen. Proteine, deren Disulfidbrücke(n) nicht reduziert sind, werden durch SDS weniger stark entfaltet. Dies resultiert in einem kleineren Stokes Radius, wodurch die oxidierte Form des Moleküls mit Disulfidbrücke(n) schneller durch das Gel wandert, als die reduzierte Form¹.

Abbildung 52 zeigt die Analyse der elektrophoretischen Mobilität von Wildtyp-HCII, HCII Δ C, HCII Δ C F195C, HCII Δ C F195C/P52C, HCII Δ C F195C/G54C, HCII Δ C F195C/S68C und HCII aus Standard-Humanplasma unter reduzierenden Bedingungen (5% 2-Mercaptoethanol im Probenpuffer) (A) bzw. unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne 2-Mercaptoethanol) (B).

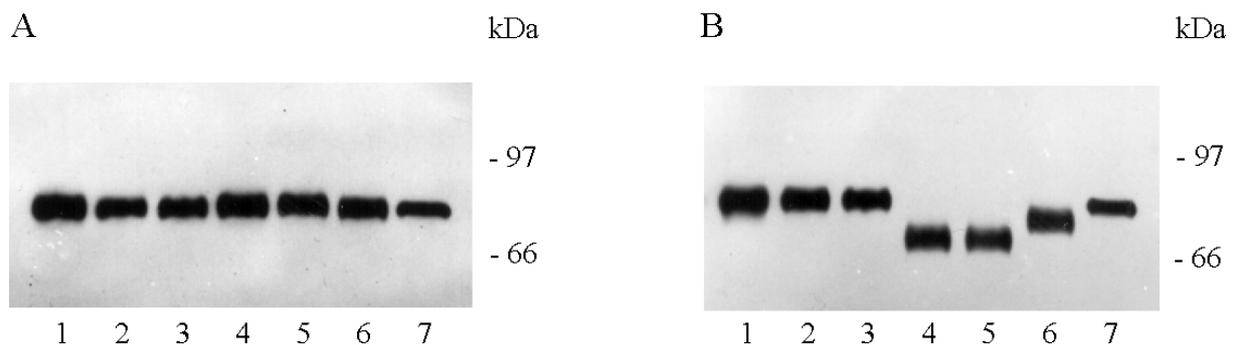


Abbildung 52: Elektrophoretische Mobilität von Wildtyp-HCII (1), HCII Δ C (2), HCII Δ C F195C (3), HCII Δ C F195C/P52C (4), HCII Δ C F195C/G54C (5), HCII Δ C F195C/S68C (6) und HCII aus Standard-Humanplasma (7) unter reduzierenden (A) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen (B) in der SDS-PAGE. Die Positionen und Größen der LMW-Markerproteine (reduziert mit 2-Mercaptoethanol) sind rechts angegeben.

¹ Pollit & Zalkin 1983, Wells & Powers 1986, Pantoliano *et al.* 1987, Matsumura & Matthews 1991, Tan *et al.* 1996, Lehle *et al.* 1996, Hopkins *et al.* 1997, Uchida *et al.* 1997

Wie aus Abbildung 52 zu erkennen ist, zeigen alle sieben HCII-Varianten unter reduzierenden Bedingungen die gleiche elektrophoretische Mobilität mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 79 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigen die drei HCII-Varianten mit zwei Cysteinresten (HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C, HCIIΔC F195C/S68C) eine erhöhte Mobilität, wohingegen alle anderen HCII-Varianten das gleiche Laufverhalten wie unter reduzierenden Bedingungen aufweisen. Das unterschiedliche Laufverhalten der drei HCII-Varianten unter reduzierenden, bzw. nicht reduzierenden Bedingungen steht in Übereinstimmung mit der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen den jeweils zwei neu ins Molekül eingeführten Cysteinresten. Zwei Fakten verdienen besondere Erwähnung:

- 1) Es überrascht, daß sich zwischen Aminosäureposition Cys195 und drei verschiedenen anderen Aminosäurepositionen (Cys52, 54 bzw. 68) Disulfidbrücken gebildet haben, obwohl die Cysteine im N-Terminus von HCII bis zu 16 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Dieser Punkt wird in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.
- 2) Das Ausmaß der erhöhten elektrophoretischen Mobilität bei den drei HCII-Varianten mit Disulfidbrücken ist abhängig von der Position der Cysteinreste und damit von der Größe der gebildeten Schleife. HCIIΔC F195C/S68C, welches die kleinste Schleife bildet, zeigt den geringsten Zuwachs an elektrophoretischer Mobilität. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Matsumura & Matthews¹, die nachgewiesen haben, daß T4-Lysozym-Varianten, die kleine intramolekulare Schleifen durch neu eingeführte Disulfidbrücken enthalten, mehr oder weniger dieselbe Mobilität in der SDS-PAGE zeigen wie Wildtypenzym.

E.7.2 Nachweis mittels Bromcyanspaltung

Wie bereits unter Abschnitt D.2.5.4 beschrieben, spaltet Bromcyan Polypeptidketten auf der carboxyterminalen Seite von Methioninresten. HCII besitzt 18 Methioninreste, die ungleichmäßig über das Protein verteilt sind (siehe Tabelle 27). Die Lage der Methioninreste im HCII bietet eine gute Möglichkeit zum Nachweis der neu eingeführten Disulfidbrücken.

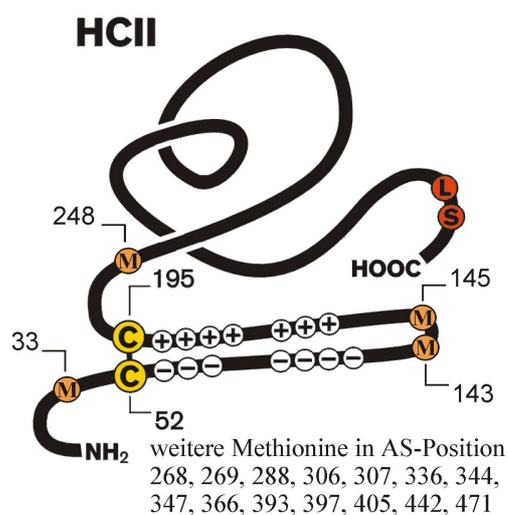


Abbildung 53: Lage der Methioninreste in HCII-Variante HCIIΔC F195C/P52C, die für den Nachweis der eingebauten Disulfidbrücke von Relevanz sind.

¹ Matsumura & Matthews 1991

Wie aus Abbildung 53 zu erkennen ist, befinden sich zwischen den neu ins HCII eingeführten Cysteinen von HCIIΔC F195C/P52C (Aminosäureposition 52 und 195) zwei Methioninreste (Positionen 143 und 145). Die Behandlung von HCIIΔC F195C/P52C mit Bromcyan sollte den Polypeptidstrang zwischen den beiden Cysteinen spalten. Unter nicht reduzierenden Bedingungen bleiben die beiden Fragmente in der SDS-PAGE über die Disulfidbrücke miteinander verbunden und durchlaufen das Gel als ein gemeinsames Fragment. Wird jedoch dasselbe Bromcyan-Spaltprodukt unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt, entstehen zwei Fragmente geringerer Größe. Entsprechendes gilt für HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C.

Tabelle 27 zeigt die Lage der Methionine im HCII-Molekül und die entstehenden Fragmentgrößen bei einer Bromcyanspaltung. Die beiden Fragmente, die durch die neu eingeführten Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, sind farblich hervorgehoben. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe des Programms PeptideMass (siehe D.1.14) errechnet.

Fragment Nr.	BrCN-Spaltposition	Beginn und Ende des Fragmentes	Fragmentgröße in Anzahl Aminosäuren	Fragmentgröße in kDa ^a
1	33	1 – 33	33	3,5 ^b
2	143	34 – 143	110	12,4^c
3	145	144 – 145	2	0,2
4	248	146 – 248	103	12,2^b
5	268	249 – 268	20	2,2
6	269	269	1	0,1
7	288	270 – 288	19	2,2
8	306	289 – 306	18	2,2
9	307	307	1	0,1
10	336	308 – 336	29	3,1
11	344	337 – 344	8	0,9
12	347	345 – 347	3	0,2
13	366	348 – 366	19	2,3
14	393	367 – 393	27	3,2 ^b
15	397	394 – 397	4	0,4
16	405	398 – 405	8	0,9
17	442	406 – 442	37	3,9
18	471	443 – 471	29	3,5
19	(480) C-Terminus	472 – 480	9	0,9

Tabelle 27: Entstehende Fragmente und Fragmentgrößen bei einer Spaltung von reifem Wildtyp-HCII durch BrCN. ^a: Posttranslationale Modifikationen sind nicht berücksichtigt. ^b: Fragment enthält eine N-Glykosylierung. ^c: Fragment enthält zwei sulfatierte Tyrosinreste.

Wie zu erkennen ist, entstehen mit Ausnahme der Fragmente Nr. 2 und Nr. 4, welche die neu eingeführten Cysteinreste tragen, nur Fragmente mit einer Größe unter 4 kDa. Zu berücksichtigen ist noch, daß die Fragmente Nr. 1, Nr. 4 und Nr. 14 eine N-Glykosylierung tragen¹ und Fragment Nr. 2 zwei sulfatierte Tyrosinreste sowie die beiden N-terminalen sauren Blöcke enthält².

Wildtyp-HCII, HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C wurden -wie unter D.2.5.4 beschrieben- mit BrCN gespalten und in nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben geteilt, einer Hälfte 5% 2-Mercaptoethanol zugesetzt, die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch identifiziert.

¹ Böhme, C; Nimtz, M.; Conradt, H.S.; Strathmann, A. und Ragg, H., unveröffentlicht

² Hortin *et al.* 1986

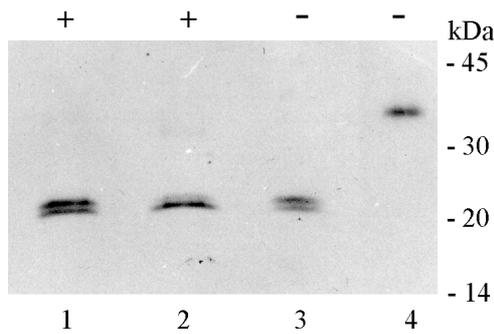


Abbildung 54: Western-Blot von reduzierten und nicht reduzierten BrCN Fragmenten von Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C. Spur 1) und Spur 3) Wildtyp-HCII, Spur 2) und Spur 4) HCIIΔC F195C/P52C
 +: Probenpuffer mit 2-Mercaptoethanol, -: Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol

Abbildung 54 zeigt die entstehenden Fragmente von Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C nach Bromcyanspaltung unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen. Wie zu erkennen ist, hat 2-Mercaptoethanol keinen Einfluß auf das Laufverhalten der Wildtyp-HCII-Fragmente. Die zwei erwarteten großen HCII-Fragmente haben apparente Molekulargewichte von ca. 21 bzw. 23 kDa. Das gleiche Bandenmuster tritt bei den reduzierten Spaltprodukten von HCIIΔC F195C/P52C auf. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ist bei HCIIΔC F195C/P52C nur eine Bande von ca. 34 kDa zu erkennen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Präsenz einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an den Aminosäurepositionen 52 und 195 und damit einer kovalenten Verknüpfung der Fragmente Nr. 2 und Nr. 4. Das Fehlen zusätzlicher Banden, lediglich eine hauchdünne, in der fotografischen Wiedergabe nicht erkennbare Bande bei ca. 30 kDa war in Spur 2 vorhanden, zeigt, daß die Spaltung nahezu vollständig erfolgt ist.

Gleiche Ergebnisse wurden für HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C erhalten (nicht abgebildet), wodurch der Beweis erbracht wurde, daß sich bei allen drei Varianten mit zwei neu eingeführten Cysteinen intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cystein 195 und Cystein 52, 54 bzw. 68 gebildet haben.

E.8 Test auf Dimerbildung

Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen zwei HCII-Molekülen über die neu in das Molekül eingeführten Cysteine konnte nicht ausgeschlossen werden. Zwei miteinander verbundene HCII-Proteine wären wahrscheinlich inaktiv, zumindest ist davon auszugehen, daß der vorgeschlagene Aktivierungsmechanismus über GAGs nicht, oder nur in geringem Ausmaße stattfindet. Die Reduktion der Disulfidbrücken könnte zur Reaktivierung führen, wodurch es zu falschen Aussagen über den Aktivierungsmechanismus von HCII durch GAGs kommen würde. Um zu testen, ob bzw. in wieweit sich HCII-Dimere bei der Produktion der verschiedenen HCII-Varianten gebildet haben, wurden Wildtyp-HCII, HCIIΔC, HCIIΔC F195C, HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C, HCIIΔC F195C/S68C aus COS7-Zellkulturüberständen und Standard-Humanplasma in einem 6% SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, geblottet und anschließend über Chemilumineszenz-Immundetektion identifiziert (siehe D.2.5.9 bis D.2.5.11).

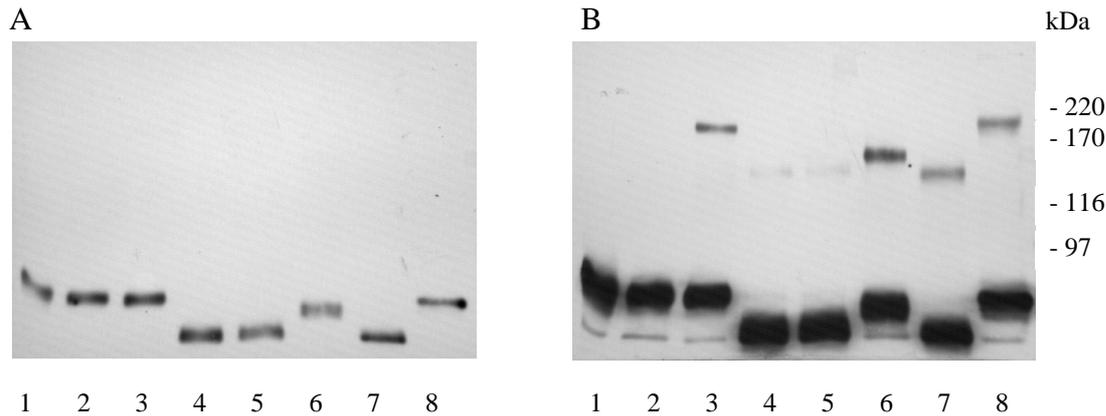


Abbildung 55: Western-Blot von Wildtyp-HCII (1), HCIIΔC (2), HCIIΔC F195C (3), HCIIΔC F195C/P52C (4), HCIIΔC F195C/G54C (5), HCIIΔC F195C/S68C (6), HCIIΔC F195C/P52C nach partieller Reinigung über Heparin-Sepharose mit linearem NaCl-Gradienten (7) und HCII aus Standard-Humanplasma (8) nach Auftrennung in einem 6% SDS-PAA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen. ECL-Hyperfilmbelichtung 15 Sekunden (A) bzw. 4 Minuten (B). (Anmerkung: nur Probe 7 ist partiell gereinigt.)

Wie aus Abbildung 55 zu ersehen ist, waren bereits nach 15 Sekunden Belichtung alle HCII-Varianten deutlich zu erkennen. Zusätzliche hochmolekulare Banden waren erst ab einer Belichtungszeit von zwei Minuten schwach zu erkennen (nicht abgebildet), bzw. deutlicher sichtbar erst ab vier Minuten Belichtung. Unter reduzierenden Bedingungen waren diese Banden nicht sichtbar (nicht abgebildet). Die apparenten Molekulargewichte lagen zwischen 190 kDa bei HCII aus Standard-Humanplasma und 137 kDa bei HCIIΔC F195C/P52C. Bei Wildtyp-HCII und der cysteinfreien Mutante von HCII waren keine Dimerbanden erkennbar. Es überrascht, daß auch die Dimerbanden unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten haben. Bei HCIIΔC F195C müßte die Dimerbildung über das einzige Cystein in Position 195 erfolgen. Die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten bei HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C könnten möglicherweise damit erklärt werden, daß sich die Disulfidbrücken der Dimere zwischen dem Cys195 eines Moleküls und Cys52, 54 bzw. 68 des zweiten Moleküls gebildet haben. Insgesamt war die Dimerbildung jedoch, wie in der Abbildung zu erkennen, gering, da sehr lange belichtet werden mußte, um Dimere überhaupt sichtbar zu machen. Am geringsten war sie bei HCIIΔC F195C/P52C und HCIIΔC F195C/G54C, am stärksten bei HCIIΔC F195C/S68C.

Neben der Bildung von Dimeren aus zwei HCII-Molekülen ist es auch denkbar, daß die detektierten hochmolekularen Banden Heterodimere aus einem HCII-Molekül und einem anderen Molekül des Zellkulturüberstands sind, wie beispielsweise das mit einer Konzentration von 10 mg/l im Medium vorhandene Transferrin.

Einen zusätzlichen Beweis dafür, daß die Dimerbildung vernachlässigbar gering war, lieferte die Bromcyanspaltung von HCIIΔC F195C/P52C (siehe E.7.2). Hätten sich in größerem Umfang Dimere gebildet, so würden zwei der großen Fragmente zweier HCII-Moleküle mit den neu eingefügten Cysteinen (siehe Tabelle 27 und Abbildung 53) unter nicht reduzierenden Bedingungen über einen Disulfidbrücke miteinander verbunden sein und bei ca. 30 kDa im Gel laufen. Bei gemischten Disulfiden (beispielsweise mit Transferrin) wäre es eines der großen HCII-Fragmente und ein Fragment des zweiten Moleküls. Das jeweilige zweite große HCII-Fragment mit einem neu eingefügten Cystein wäre jedoch frei und würde bei ca. 20 kDa laufen. Das Fehlen einer 20 kDa-Bande unter nicht reduzierenden Bedingungen unterstützt die Aussage, daß sich Dimere nur in unbedeutendem Umfang gebildet haben.

Bei genauer Betrachtung ist in den Spuren 4) und 5) in Teil B) einen ganz schwache Bande in Höhe der reduzierten Form der beiden HCII-Varianten zu erkennen (durch Qualitätsverluste beim Drucken möglicherweise nicht sichtbar). Sie zeigt, daß anscheinend auch in COS7-Zellen ein, wenn auch sehr geringer Anteil, an reduzierter Form entstanden ist.

E.9 Bestimmung der minimalen DTT-Konzentration zur Reduktion der eingebauten Disulfidbrücke

Zur Ermittlung von Bedingungen, unter denen die neu ins HCII eingeführte Disulfidbrücke vollständig reduziert wird, wurden konzentrierte und in 1 x Komplexierungspuffer pH 8,0 umgepufferte COS7-Zellkulturüberstände (siehe D.2.5.3) von Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C mit steigenden Mengen an DTT für 20 Minuten unter Stickstoffatmosphäre bei 25°C inkubiert und unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt.

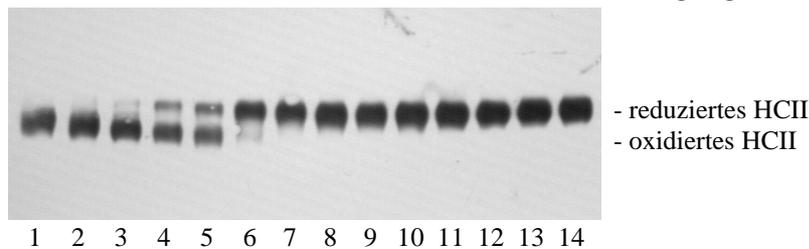


Abbildung 56: Western-Blot von HCIIΔC F195C/P52C (1-7) und Wildtyp-HCII (8-14) nach Reduktion mit 1 μM (1 u. 8), 5 μM (2 u. 9), 10 μM (3 u. 10), 50 μM (4 u. 11), 100 μM (5 u.12), 500 μM (6 u.13) oder 1 mM (7 u. 14) DTT

Wie aus Abbildung 56 zu erkennen ist, ist für eine nahezu vollständige Reduktion von HCIIΔC F195C/P52C eine DTT-Konzentration von 500 μM bis 1 mM notwendig. Eine partielle Reduktion liegt bereits bei 10 μM vor. Das als Kontrolle aufgetragene Wildtyp-HCII zeigt erwartungsgemäß keine Beeinflussung seines Laufverhaltens durch DTT-Behandlung.

E.10 HCII/Thrombin-Komplexierung in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat mit bzw. ohne DTT-Zugabe

Konzentrierte und in 1 x Komplexierungspuffer umgepufferte Zellkulturüberstände von sechs verschiedenen HCII-Varianten (Wildtyp-HCII, HCIIΔC, HCIIΔC F195C, HCIIΔC F195C/P52C, HCIIΔC F195C/G54C, HCIIΔC F195C/S68C) und Standard-Humanplasma wurden -wie unter D.2.5.8.1 beschrieben- in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 mM DTT mit 10 U/ml Heparin (entspricht 57 μg/ml) oder 300 μg/ml Dermatansulfat mit humanem Thrombin für 20 Minuten inkubiert.

In einem Vorversuch, wurde eine mögliche Beeinträchtigung der biologischen Aktivität von Thrombin, welches aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundene Ketten besteht, durch DTT untersucht. Thrombin wurde hierzu in konzentriertem Zellkulturüberstand (pH 8,0) von nicht transfizierten COS7-Zellen für bis zu zwei Stunden mit 1 mM DTT bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde es mit Wildtyp-HCII und Dermatansulfat -wie unter D.2.5.8.1 beschrieben- komplexiert. Zwischen nicht reduzierten Proben und Proben, die bis zu zwei Stunden reduziert waren, konnte im Western-Blot kein Unterschied bezüglich der Fähigkeit von Thrombin mit HCII Komplexe zu bilden erkannt werden (nicht abgebildet). In der Literatur¹ gibt es dazu ähnliche Untersuchungen. Eine 30-minütige Inkubation von Thrombin mit 1 mM DTT verminderte die Fähigkeit von Thrombin ein künstliches Substrat zu spalten um weniger als 10%. Die Fähigkeit Fibrinogen in einem Gerinnungstest zu aktivieren wurde bei 30-minütiger Inkubation von Thrombin mit 1 mM DTT allerdings auf ca. ¼ reduziert. Bei 30-sekündiger Inkubation wurde unter diesen Bedingungen keine Inaktivierung von Thrombin beobachtet.

¹ Longas *et al.* 1980

Sofern Thrombin durch DTT in seiner Funktion beeinträchtigt wird, scheint dies jedoch, wie der Vorversuch zeigte, keinen signifikanten Einfluß auf seinen Fähigkeit zu haben, mit HCII zu reagieren.

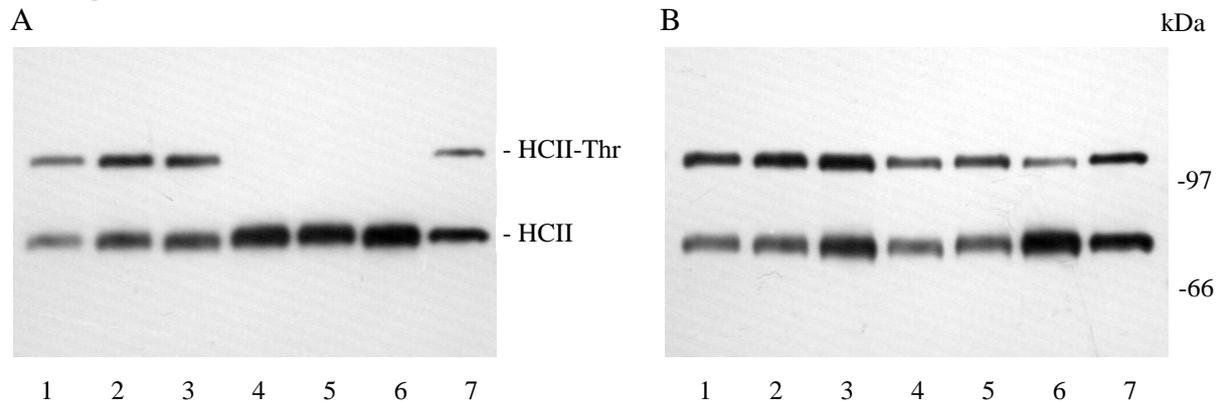


Abbildung 57: Komplexbildung von Wildtyp-HCII (1), HCII Δ C (2), HCII Δ C F195C (3), HCII Δ C F195C/P52C (4), HCII Δ C F195C/G54C (5), HCII Δ C F195C/S68C (6) und Standard-Humanplasma (7) mit Thrombin in der Gegenwart von Heparin (10 U/ml) nach Vorbehandlung von HCII ohne (A) bzw. mit 1 mM DTT (B). HCII: nicht komplexiertes HCII, HCII-Thr: HCII-Thrombinkomplexe

Abbildung 57 zeigt, daß Wildtyp-HCII, HCII Δ C, HCII Δ C F195C und HCII aus Standard-Humanplasma unabhängig vom Vorhandensein von DTT nach Aktivierung durch Heparin unter Bildung SDS-stabiler Komplexe mit Thrombin reagierten. Die drei HCII-Varianten mit Disulfidbrücken zeigten ein deutlich unterschiedliches Verhalten. In Abwesenheit von DTT (Teil A), d.h. bei geschlossener Disulfidbrücke, konnte bei alle drei Varianten trotz optimaler Konzentration an Heparin keine Komplexbildung mit Thrombin nachgewiesen werden. Nach Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT (Teil B) zeigten alle drei Varianten ein dem Wildtyp vergleichbares Verhalten. Dies bedeutet, sie wurden durch Heparin in eine Form überführt, die mit hoher Effizienz Komplexe mit Thrombin bildete. Gleiche Ergebnisse wurden für die Aktivierung der HCII-Varianten mit Dermatansulfat erzielt (nicht abgebildet).

Die Ergebnisse sind mit einem allosterischen Aktivierungsmechanismus von HCII vereinbar, nach dem der saure Aminoterminus von HCII durch GAGs von seiner intramolekularen Wechselwirkung verdrängt wird und über eine Interaktion mit Exosite I von Thrombin dessen Inaktivierung stark beschleunigt wird.

Bei geschlossener Disulfidbrücke blieb der N-Terminus der HCII-Varianten am Kern des Moleküls fixiert, so daß er auch durch Heparin- oder Dermatansulfat nicht freigesetzt werden konnte. Sofern Thrombin durch die oxidierte Form überhaupt inhibiert wurde, geschah dies trotz Vorhandensein von GAGs nur mit so geringer Effizienz, daß es mit dem hier durchgeführten Test, auch nach 20 minütiger Inkubation, nicht detektierbar war. Erst die Reduktion der Disulfidbrücke durch DTT ermöglichte die Aktivierung durch GAGs, die dem Modell nach mit der Freisetzung des Aminoterminus verbunden ist. Zum Vergleich: Die Reaktion der reduzierten Form von HCII Δ C F195C/P52C mit Thrombin in Gegenwart von Heparin war bereits innerhalb von 75 Sekunden weitgehend abgeschlossen (siehe E.13).

Zwei Beobachtungen verdienen Erwähnung:

- 1) Die drei natürlich im HCII vorkommenden Cysteine sind, obwohl bei allen bisher untersuchten Wildtyp-HCIIIs aus verschiedenen Spezies konserviert¹, qualitativ nicht essentiell für die Heparin- oder Dermatansulfat-beschleunigte Hemmung von Thrombin. HCII Δ C zeigt vergleichbares Verhalten wie Wildtyp-HCII. Dies ist in Übereinstimmung mit der Veröffentlichung von Church *et al.*², nach der eine Alkylierung der natürlich vorkommenden Cysteine durch Iodacetamid oder Iodacetat keinen Einfluß auf die Heparin-

¹ Ragg 1986, Westrup & Ragg 1994, Zhang *et al.* 1994, Sheffield *et al.* 1994, Colwell & Toleffsen 1998

² Church *et al.* 1987

katalysierte Thrombinhemmung hatte. Ein Austausch der drei Cysteine im HCII gegen Serin wurde allerdings bisher noch nicht beschrieben.

- 2) HCII Δ C F195C/S68C (aus verschiedenen Transfektionen) zeigte bei allen durchgeführten Experimenten eine geringere Aktivität nach GAG-Zugabe als die anderen Varianten. Dies verwundert ein wenig, da die Veröffentlichung von Ragg *et al.*¹ zeigte, daß die Mutation von Ser68 zu Glutamat nur geringfügigen Einfluß auf die Aktivierung von HCII durch Heparin hat. Die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion wurde davon nicht beeinflußt.

E.11 Reoxidation von HCII Δ C F195C/P52C *in vitro*

Der vorhergehende Versuch hat gezeigt, daß die neu hergestellten HCII-Varianten bei geschlossener Disulfidbrücke in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat im Thrombin-Komplexierungstest keine meßbare Aktivität gegenüber Thrombin zeigten. Nach Reduktion zeigten sie ein Verhalten, welches qualitativ mit dem von Wildtyp-HCII vergleichbar ist. Neben der Interpretation, daß die Freisetzung des sauren Aminoterminus essentiell ist für die allosterische Aktivierung von HCII durch GAGs, lassen sich die erhaltenen Ergebnisse aus theoretischer Sicht auch noch folgendermaßen anders deuten.

Bei der kotranslationalen Faltung in endoplasmatischem Retikulum (ER) wurde HCII durch die Bildung der neu ins Molekül eingefügten Disulfidbrücke in eine nicht-physiologische unnatürliche Konformation gezwungen. In diesem Zustand war das Molekül inaktiv und nicht in der Lage mit Thrombin zu reagieren. Nach Reduktion konnte sich das Molekül wieder in seine natürliche aktive Konformation zurückfalten. Obwohl dies aufgrund der bisherigen Vorarbeiten², die klar dafür sprechen, daß sich der N-Terminus in der Nachbarschaft der α -Helix D befindet, unwahrscheinlich erscheint, ist es theoretisch nicht auszuschließen und würde zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse des vorhergegangenen Experiments führen. Aus diesem Grund wurde die Disulfidbrücke von reduziertem HCII Δ C F195C/P52C aus stabil transfizierten CHO DUKX B1-Zellen (siehe E.4.3) *in vitro* mit Kupfer-(II)-Phenanthrolin bzw. oxidiertem Glutathion behandelt (siehe D.2.5.7) und anschließend mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (siehe D.2.5.9 bis D.2.5.11).

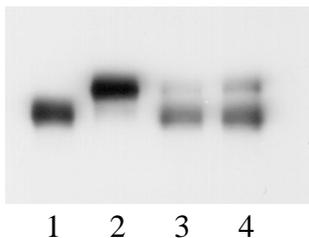


Abbildung 58: Reduktion und Reoxidation von rekombinantem HCII Δ C F195C/P52C *in vitro*

1) Zellkulturüberstand vor der Reduktion; 2): Zellkulturüberstand nach Reduktion und Dialyse; 3) Reoxidation mit Kupfer-(II)-Phenanthrolin ü.N. bei RT; 4) Reoxidation mit oxidiertem Glutathion ü.N. bei RT

Wie in Abbildung 58 zu erkennen ist, kann reduziertes HCII Δ C F195C/P52C sowohl mit Kupfer-(II)-Phenanthrolin, als auch mit oxidiertem Glutathion reoxidiert werden. Mit Kupfer-(II)-Phenanthrolin lassen sich ca. 90% der HCII-Variante reoxidieren, mit oxidiertem Glutathion etwas weniger.

Der Versuch zeigt, daß der saure N-Terminus und der carboxyterminale Bereich von α -Helix D auch im reduzierten, biologisch aktiven HCII-Molekül so nahe zusammenkommen können, daß sich zwischen ihnen eine Disulfidbrücke bilden kann. Dies spricht stark dafür, daß es bezüglich der Lage der Cysteinreste höchstens geringfügige Konformationsunterschiede zwischen der oxidierten und der reduzierten aktiven Form von HCII Δ C F195C/P52C geben

¹ Ragg *et al.* 1990a

² Ragg *et al.* 1990 a & b, Ciaccia *et al.* 1997 b, Liaw *et al.* 1999

kann, andernfalls wäre eine Reoxidation der Cysteinreste zur Disulfidbrücke vermutlich nicht möglich gewesen. Es erscheint damit unwahrscheinlich, daß HCII Δ C F195C/P52C *in vivo* durch die Bildung der Disulfidbrücke in eine unnatürliche Faltung gezwängt wurde.

E.12 Reduktion und Alkylierung von HCII-Varianten für kinetische Messungen

Für die nachfolgenden kinetischen Messungen wurden die HCII-Varianten reduziert und alkyliert, wie unter D.2.5.5 beschrieben. Der Vorteil der Alkylierung freier Cysteinreste lag darin, daß eine Reoxidation zur Disulfidbrücke durch gelösten Sauerstoff ausgeschlossen werden konnte. Zudem konnte eine mögliche, mit den Vorversuchen nicht erkennbaren Thrombinaktivierung durch DTT bei den Messungen mit einer Versuchsdauer von bis zu fünf Stunden ausgeschlossen werden.

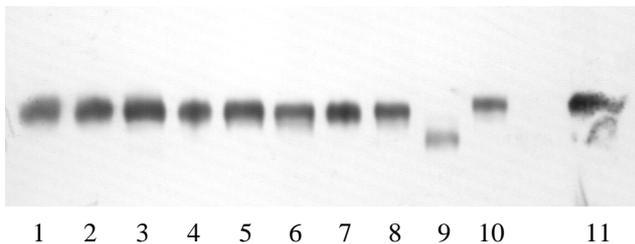


Abbildung 59: nicht reduzierende SDS-PAGE von HCII-Varianten nach Reduktion und Alkylierung (red/alk) bzw. unbehandelt 1) Wildtyp-HCII, 2) Wildtyp-HCII red/alk, 3) HCII F195C, 4) HCII F195C red/alk, 5) HCII Δ C, 6)HCII Δ C red/alk, 7) HCII Δ C F195C, 8) HCII Δ C F195C red/alk, 9) HCII Δ C F195C/P52C, 10) HCII Δ C F195C/P52C red/alk, 11) Standard-Humanplasma unbehandelt

Abbildung 59 zeigt, daß HCII Δ C F195C/P52C durch Reduktion und Alkylierung elektrophoretische Laufeigenschaften erhält, die mit denen von Standard-Humanplasma übereinstimmen, wohingegen unbehandeltes HCII Δ C F195C/P52C eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufweist. Die anderen untersuchten HCII-Varianten zeigen keine Unterschiede, unabhängig von Reduktion und Alkylierung.

E.13 Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Anwesenheit von GAGs

Reduzierte und alkylierte bzw. unbehandelte Zellkulturüberstände aus der Transfektion von COS7-Zellen wurden auf eine einheitliche HCII-Konzentration von 0,68 μ g/ml eingestellt und -wie unter D.2.5.8.2.1 beschrieben- in der Anwesenheit von 10 U/ml Heparin (entspr. 57 μ g/ml) oder 1 mg/ml Dermatansulfat mit Humanthrombin bei einem molaren Inhibitor/Protease-Verhältnis von 2:1 inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der prozentuale Anteil an komplexiertem HCII nach Western-Blot densitometrisch bestimmt. Der Versuch wurde jeweils zweimal durchgeführt, und die ECL[®]-Hyperfilme bei der Chemilumineszenz-Immudetektion jeweils 60, 90 bzw. 120 Sekunden belichtet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen dargestellt. Angegeben ist jeweils der densitometrisch bestimmte Anteil der HCII-Thrombinkomplexe am gesamten HCII (bestehend aus freiem HCII und HCII, welches mit Thrombin komplexiert ist).

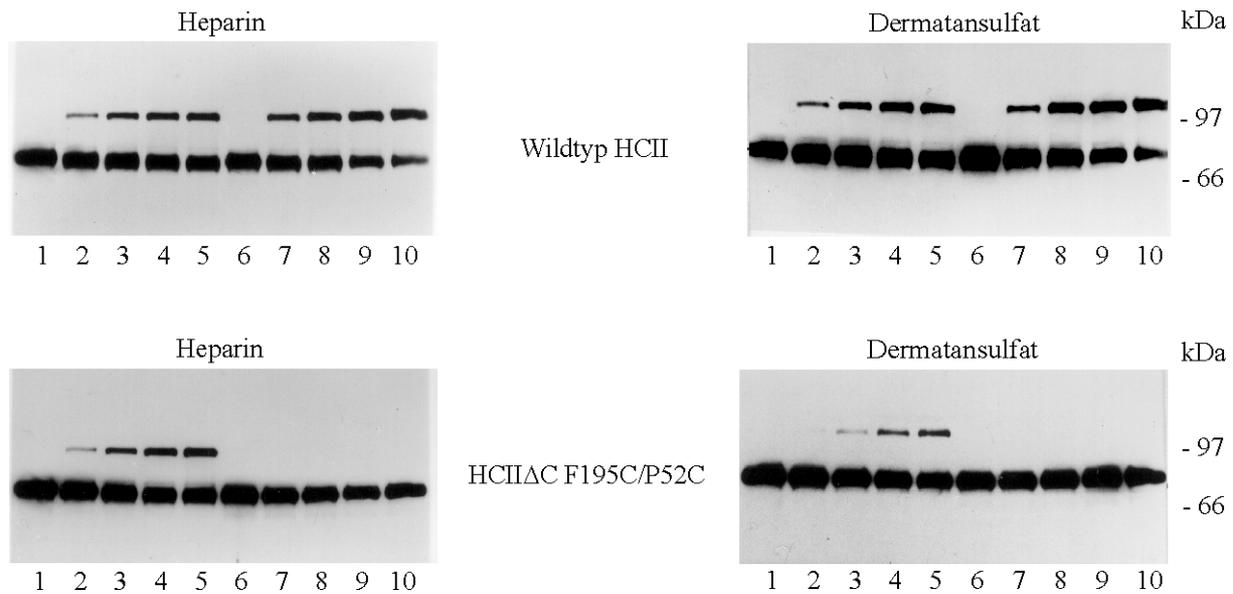


Abbildung 60: Zeitabhängige Komplexierung von reduzierten und alkylierten (1-5) bzw. unbehandelten (6-10) COS7-Zellkulturüberständen von Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C. Aliquots der Reaktionsansätze wurden vor Thrombinzugabe (1 und 6), bzw. 15 Sekunden (2 und 7), 30 Sekunden (3 und 8), 75 Sekunden (4 und 9) und 3 Minuten (5 und 10) nach Thrombinzugabe entnommen.

HCII-Variante	Heparin [10 U/ml = 57 µg/ml]					Dermatansulfat [1000 µg/ml]				
	0 sec	15 sec	30 sec	75 sec	3 min	0 sec	15 sec	30 sec	75 sec	3 min
Wildtyp-HCII	0 %	22,8 % s:±5,1	31,3 % s:±3,4	39,3 % s:±5,9	47 % s:±6,9	0 %	23,5 % s:±3,6	35,3 % s:±0,5	46,6% s:±2,7	55,2% s:±3,9
Wildtyp-HCII reduziert u. alkyliert	0 %	11,3 % s:±1,9	21,5 % s:±4,0	27,2 % s:±3,1	29,3 % s:±3,5	0 %	11,2 % s:±1,9	22,7 % s:±1,4	31,0 % s:±0,6	32,2 % s:±1,8
HCII F195C	0 %	14,5 % s:±5,4	24,0 % s:±1,4	31,7 % s:±1,8	32,2 % s:±3,5	0 %	7,5 % s:±1,5	17,3 % s:±1,8	27,3 % s:±1,4	27,3 % s:±1,8
HCII F195C reduziert u. alkyliert	0 %	17,8 % s:±1,3	23,8 % s:±1,8	36,0 % s:±6,6	36,7 % s:±3,3	0 %	6,7 % s:±1,5	17,7 % s:±2,1	26,8 % s:±1,0	32,3 % s:±2,9
HCIIΔC	0 %	15,7 % s:±2,6	25,5 % s:±2,9	31,5 % s:±4,3	35,7 % s:±4,3	0 %	11,3 % s:±1,6	21,0 % s:±1,7	27,7 % s:±2,9	32,0 % s:±2,0
HCIIΔC reduziert u. alkyliert	0 %	5,3 % s:±4,7	17,2 % s:±2,4	27,8 % s:±0,8	27,0 % s:±1,3	0 %	4,8 % s:±4,4	12,2 % s:±3,2	24,2 % s:±1,5	28,2 % s:±5,7
HCIIΔC F195C	0 %	17,0 % s:±2,3	26,0 % s:±1,1	33,2 % s:±1,8	39,8 % s:±0,8	0 %	1,2 % s:±0,5	5,2 % s:±2,2	15,3 % s:±5,1	26,2 % s:±5,8
HCIIΔC F195C reduziert u. alkyliert	0 %	5,8 % s:±2,4	15,7 % s:±2,0	23,8 % s:±1,5	28,0 % s:±1,5	0 %	0,5 % s:±0,5	2,5 % s:±1,0	9,3 % s:±2,1	20,5 % s:±1,8
HCIIΔC F195C/P52C	0 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
HCIIΔC F195C/P52C reduziert u. alkyliert	0 %	10,8 % s:±3,9	21,3 % s:±2,3	32,3 % s:±5,1	36,5 % s:±5,7	0 %	0,7 % s:±0,5	7,0 % s:±2,3	18,7 % s:±2,6	22,5 % s:±3,1

Tabelle 28: Prozentualer Anteil der HCII-Thrombinkomplexe und Standardabweichung (s) der erhaltenen Werte bei der zeitabhängigen Komplexierung von reduzierten und alkylierten bzw. unbehandelten COS7-Zellkulturüberständen mit Humanthrombin. n.n.: nicht nachweisbar

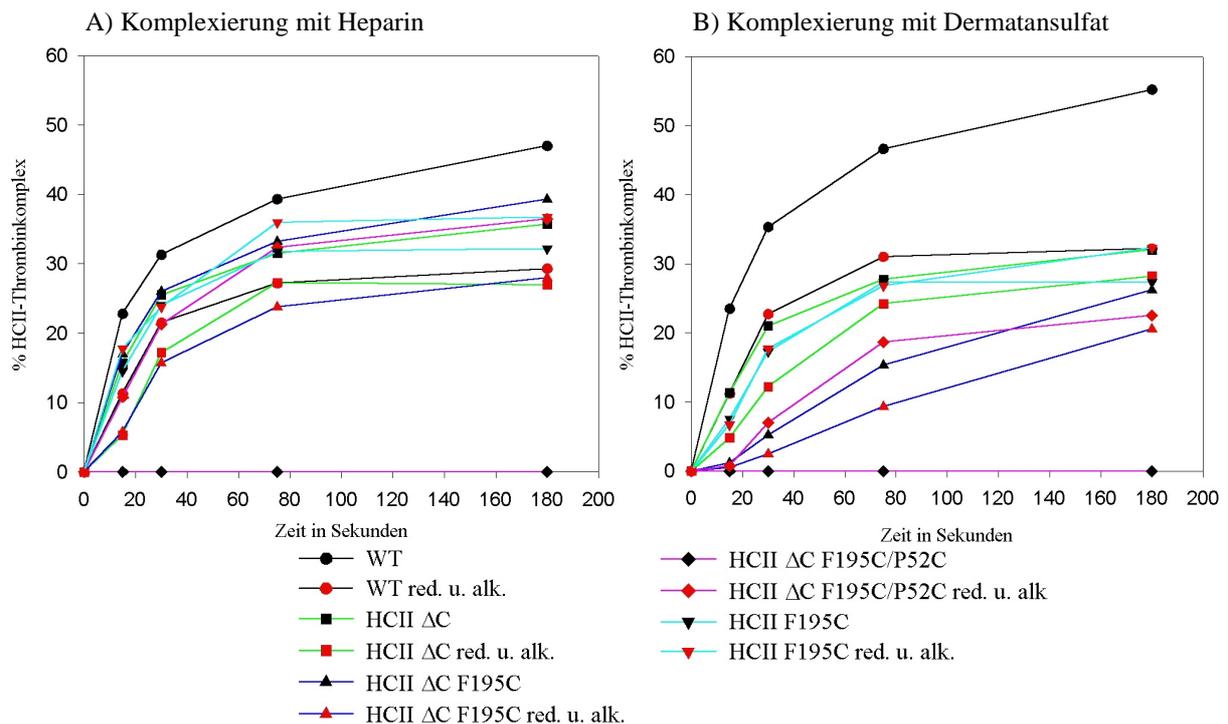


Abbildung 61: Zeitabhängige Komplexierung von reduzierten und alkylierten bzw. unbehandelten HCII-Varianten mit 10 U/ml Heparin (A) oder 1 mg/ml Dermatansulfat (B). (graphische Darstellung der Werte in Tabelle 28)

Die durchgeführten Versuche bestätigten die bereits im Abschnitt E.10 erhaltenen Ergebnisse. HCIIΔC F195C/P52C zeigte in seiner oxidierten Form auch in Anwesenheit von GAGs keine erkennbare Reaktion mit Thrombin. Das Öffnen der Disulfidbrücke durch Reduktion und Alkylierung überführte die HCII-Variante in einen Zustand, der Thrombin in der Anwesenheit von Heparin oder Dermatansulfat effektiv komplexierte. Dies steht in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß eine Positionsänderung des N-Terminus gegenüber dem Kern des Moleküls ein wichtiger Bestandteil der Aktivierung von HCII durch GAGs ist. Die anderen HCII-Varianten reagierten weitgehend unabhängig vom Reduktion und Alkylierung mit Thrombin.

Bei allen HCII-Varianten außer HCII F195C war zu erkennen, daß die reduzierte und alkylierte Form des Inhibitors langsamer mit Thrombin reagierte, als die unbehandelte. Da dieser Effekt auch bei der Cystein-freien Variante HCIIΔC zu erkennen war, muß von einer, auch in der Literatur beschriebenen¹, unspezifischen Alkylierung anderer Aminosäurereste wie Methionin, Histidin und Lysin ausgegangen werden, die HCII partiell geschädigt hat. (Beachte: Histidin- und Lysinreste sind für die Bindung von GAGs an die GAG-Bindestelle von Bedeutung².) Die Reduktion, Alkylierung und Umpufferung der Varianten HCII F195C mit Hilfe von Mikrokonzentratoren, ebenso wie die kinetischen Messungen wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, als die Experimente mit den anderen HCII-Varianten, welche parallel reduziert, alkyliert, umgepuffert sowie quantitativ untersucht wurden. Der Grund dafür, daß die reduzierte und alkylierte Form von HCII F195C keine Verlangsamung der Reaktion mit Thrombin zeigte, könnte jedoch auch lediglich eine Folge der Ungenauigkeit der verwendeten Methode sein (siehe hierzu F.7.4).

¹ Lundell & Schreitmüller 1999

² Ragg *et al.* 1990 a & b, Whinna *et al.* 1991, Liaw *et al.* 1999

Interessante Unterschiede sind beim Vergleich der Heparin- und Dermatansulfat-katalysierten Reaktion zu beobachten. (Sofern möglich wird hierbei aus oben genannten Gründen stärkere Wichtung auf die nicht-alkylierte Form der Inhibitoren gelegt.) Wie aus Abbildung 61 und Tabelle 29 zu erkennen ist, verlief die Heparin-katalysierte Reaktion bei allen untersuchten Varianten mit Ausnahme von HCII Δ C F195C/P52C mit geschlossener Disulfidbrücke in etwa vergleichbar. Deutliche Unterschiede waren jedoch bei der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion zu erkennen. Wildtyp-HCII reagierte in Gegenwart von Dermatansulfat schneller mit Thrombin als in Gegenwart von Heparin, ein Fakt der auch in der Literatur beschrieben wird¹. Alle anderen HCII-Varianten hingegen reagierten in Gegenwart von Dermatansulfat langsamer als in Gegenwart von Heparin, teilweise mit erheblichen Abweichungen, obwohl für beide Reaktionen gleiches Ausgangsmaterial verwendet wurde.

HCII Variante	Abweichung der Dermatansulfat-katalysierten Komplexierung gegenüber der Heparin-katalysierten Komplexierung				
	0 sec	15 sec	30 sec	75 sec	3 min
Wildtyp-HCII	0 %	+ 3 %	+ 13 %	+ 19 %	+ 17%
Wildtyp-HCII reduziert u. alkyliert	0 %	- 1 %	+ 6 %	+ 14 %	+ 10 %
HCII F195C	0 %	- 48 %	- 28 %	- 14 %	- 15 %
HCII F195C reduziert u. alkyliert	0 %	-62 %	- 26 %	- 26 %	- 12 %
HCII Δ C	0 %	- 28 %	- 18 %	-12 %	- 10 %
HCII Δ C reduziert u. alkyliert	0 %	- 9 %	- 29 %	- 13 %	+ 4 %
HCII Δ C F195C	0 %	- 93 %	- 80 %	- 54 %	- 34 %
HCII Δ C F195C reduziert u. alkyliert	0 %	- 91 %	- 84 %	- 61 %	- 27 %
HCII Δ C F195C/P52C	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HCII Δ C F195C/P52C reduziert u. alkyliert	0 %	- 94 %	- 67 %	- 42 %	- 38 %

Tabelle 29: Prozentuale Abweichung der entstandenen Mengen an HCII-Thrombin-Komplexen zwischen der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion im Vergleich zur Heparin-katalysierten Reaktion. Die aussagekräftigsten Messwerte sind jeweils die ersten beiden Messungen bei 15 Sekunden und 30 Sekunden. Bei späteren Messzeitpunkten flachen die Kurven z.T. merklich ab (siehe Abbildung 61).

HCII Δ C zeigte bereits gegenüber Wildtyp-HCII eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit bei der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion verglichen mit der Heparin-katalysierten Reaktion. Möglicherweise bewirkte der Einbau der stärker polaren Serine gegenüber Cystein bereits einen geringen Einfluß auf die Aktivierung durch Dermatansulfat. Bedingt durch die Ungenauigkeit der verwendeten Methode (siehe dazu später) bedarf diese Annahme jedoch genauerer Untersuchung.

Sehr viel deutlicher wird die Verlangsamung der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion bei HCII Δ C F195C. Diese HCII-Variante unterscheidet sich von HCII Δ C nur durch den Austausch von Phe195 gegen Cystein. Die Messwerte legen die Vermutung nahe, daß der Austausch von Phe195 einen stark negativen Einfluß auf die Aktivierung von HCII durch Dermatansulfat hatte. In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß die GAG-Bindestellen für Heparin und Dermatansulfat nur partiell überlappen, und daß die Dermatansulfat-

¹Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989,

Bindestelle sich näher am Carboxyende der GAG-Bindestelle befindet¹. Es erscheint denkbar, daß der voluminöse Phenylalaninrest eine wichtige Funktion für die Dermatansulfat-katalysierte Aktivierung von HCII hat, und daß diese Funktion nur unzureichend durch Cystein ersetzt werden kann. Gleiches gilt für HCIIΔC F195C/P52C, das in der reduzierten Form dasselbe Verhalten zeigte (siehe auch Abbildung 60).

Bekräftigt wird die Vermutung, daß Phe195 eine Funktion bei der Dermatansulfat-katalysierten Hemmung von Thrombin durch HCII hat, durch die HCII-Variante HCII F195C, bei der gegenüber dem Wildtyp nur Phe195 gegen Cystein ausgetauscht ist. Auch diese Variante zeigte eine verminderte Aktivität in Gegenwart von Dermatansulfat.

In der Literatur werden unterschiedliche optimale Konzentrationen für die Dermatansulfat-vermittelte HCII-Aktivierung angegeben² (250 bis 1000 µg/ml). In Vorversuchen mit HCIIΔC F195C hatte sich eine Dermatansulfat-Konzentration von 1000 µg/ml als die effektivste erwiesen. Die Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Dermatansulfat verglichen mit Heparin wurde für HCIIΔC F195C und HCIIΔC F195C/P52C jedoch auch bei einer Konzentration von 300 µg/ml Dermatansulfat beobachtet (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die erhaltenen Messwerte zeigten teilweise recht große Abweichungen, wie anhand der Standardabweichung zu erkennen ist. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden die ECL[®]-Hyperfilme jeweils gleich lange belichtet. Unterschiede gab es aber zwangsläufig bei der Entwicklungsdauer. Die Filme wurden so lange im Entwicklerbad gelassen bis Komplexbanden erkennbar waren. Standardisierte Entwicklungszeiten hatten sich als ungeeignet erwiesen, da die Blottingeffizienz nicht konstant und gleichmäßig genug war. Längeres Entwickeln bedingte allerdings, daß schwächere Banden im Verhältnis stärker an Intensität gewannen als starke Banden, bei denen der darüberliegende Film bereits nach kürzerer Zeit vollständig entwickelt war.

Der Effekt der Mutation F195C war jedoch so deutlich, daß er trotz der Ungenauigkeit der Methode gesichert erscheint. Eine mögliche Beeinflussung der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion von HCIIΔC durch den Austausch der drei natürlich vorkommenden Cysteine gegen Serine konnte jedoch nicht sicher gezeigt werden. Hierfür müßte entweder eine deutlich höhere Zahl an Einzelversuchen durchgeführt werden, oder/und Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung bestimmt werden.

Die oxidierte Form von HCIIΔC F195C/P52C mit geschlossener Disulfidbrücke wurde auch in der Anwesenheit von Heparin und Dermatansulfat mit Thrombin inkubiert und Proben nach 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten entnommen. Nach 20-minütiger Belichtung des ECL[®]-Hyperfilm konnten sehr schwache HCII-Thrombin-Komplexbanden schon in den 30 bzw. 60 Minuten inkubierten Proben entdeckt werden (nicht dargestellt). Die Banden wurden aber mit zunehmender Inkubationsdauer immer schwächer. Da die Banden insgesamt extrem schwach waren, ist zu vermuten, daß hier der im Zellkulturüberstand enthaltene sehr geringe Anteil von reduziertem HCIIΔC F195C/P52C (siehe E.8) durch die GAGs aktiviert wurde und sehr schnell mit Thrombin reagierte. Anschließend wurden der Komplex möglicherweise durch freies Thrombin langsam wieder abgebaut.

Denkbar ist zusätzlich, daß Heparin durch Brückenbildung (siehe B.5.2) einen ternären Komplex zwischen dem oxidierten HCIIΔC F195C/P52C und Thrombin erzeugt hat, der mit sehr geringer Effizienz zur Bildung von HCII-Thrombinkomplexen führte. Dieser Mechanismus ist im beschriebenen Experiment auch für die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion denkbar, da die Heparin-Verunreinigungen im Dermatansulfat nicht durch Natriumnitrit-Behandlung entfernt worden waren.

¹Blinder *et al.* 1989, Ragg *et al.* 1990 b

²Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989

E.14 Kinetik der HCII/Thrombin-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Behandlung mit DTT und Iodacetamid in Abwesenheit von GAGs

Reduzierte und alkylierte bzw. unbehandelte Zellkulturüberstände aus der Transfektion von COS7-Zellen mit Wildtyp-HCII, HCII Δ C, HCII Δ C F195C und HCII Δ C F195C/P52C wurden auf eine einheitliche HCII-Konzentration von 0,68 μ g/ml eingestellt und -wie unter D.2.5.8.2.2 beschrieben- in der Abwesenheit von GAGs mit Humanthrombin bei einem molaren Inhibitor/Protease-Verhältnis von 2:1 inkubiert. Vor Thrombinzugabe, bzw. 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Zugabe wurden Proben entnommen und mittels Western-Blot ausgewertet.

Sowohl für die reduzierte und alkylierte, als auch für die unbehandelte Form von HCII Δ C F195C/P52C wurde der Versuch bei gleicher HCII-Konzentration, aber mit einem molaren Verhältnis von Inhibitor zu Protease von 1:2 wiederholt.

Abbildung 62 zeigt vergleichend die Ergebnisse für reduziertes und alkyliertes bzw. unbehandeltes Wildtyp-HCII bei einem Inhibitor/Protease-Verhältnis von 2:1, sowie für reduziertes und alkyliertes bzw. unbehandeltes (oxidiertes) HCII Δ C F195C/P52C bei einem Inhibitor/Protease-Verhältnis von 1:2. Die HCII-Konzentration ist dabei in beiden Teilversuchen identisch, lediglich das HCII/Thrombin-Verhältnis ist variabel.

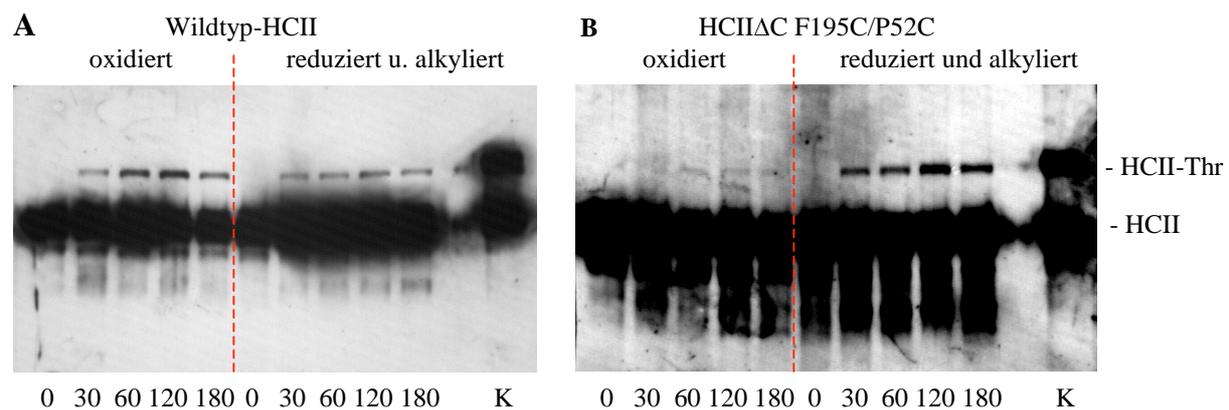


Abbildung 62: Komplexbildung von A) Wildtyp-HCII (molares Inhibitor/Protease-Verhältnis 2:1) und B) HCII Δ C F195C/P52C (molares Inhibitor/Protease-Verhältnis 1:2) mit Humanthrombin in der Abwesenheit von GAGs. Das Material wurde unbehandelt (oxidiert) bzw. reduziert und alkyliert in die Reaktion eingesetzt und Aliquots der Reaktion vor Thrombinzugabe (0) bzw. nach den, unter dem Bild angegebenen Zeiten (in Minuten) entnommen und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

K: Kontroll-Komplexierung zwischen reduziertem und alkyliertem HCII und Thrombin unter Zugabe von 10 U/ml Heparin für 75 Sekunden. HCII: nicht komplexiertes HCII, HCII-Thr: HCII-Thrombinkomplexe

Bei einem molaren Inhibitor/Protease-Verhältnis von 2:1 konnten nur bei der unbehandelten, oxidierten Form von HCII Δ C F195C/P52C nach 20-minütiger Belichtung des ECL[®]-Hyperfilms keine HCII-Thrombin-Komplexe detektiert werden (nicht abgebildet). Bei allen anderen HCII-Varianten, einschließlich der reduzierten und alkylierten Form von HCII Δ C F195C/P52C konnten unter diesen Bedingungen HCII-Thrombin-Komplexe nachgewiesen werden, jedoch mit deutlichen Intensitätsunterschieden. Die deutlichsten Komplexbanden entstanden bei Wildtyp-HCII (siehe Abbildung 62 A) und der unbehandelten Form von HCII Δ C, die schwächsten bei HCII Δ C F195C und der reduzierten und alkylierten Form von HCII Δ C F195C/P52C. Insgesamt gilt auch hier wieder, mit Ausnahme von HCII Δ C F195C/P52C, daß die unbehandelten Formen der HCII-Varianten HCII stärker mit Thrombin reagierten, als die reduzierten und alkylierten. Von der Versuchsreihe mit einem molaren Inhibitor/Protease-Verhältnis von 2:1 ist exemplarisch lediglich die Reaktion von Wildtyp-HCII mit Thrombin dargestellt (Abbildung 62 Teil A).

Zur weiteren Untersuchung der Reaktion zwischen HCIIΔC F195C/P52C und Thrombin wurde das Inhibitor/Protease-Verhältnis auf 1:2 geändert und der ECL[®]-Hyperfilm für bis zu 35 Minuten belichtet. Die HCII-Konzentration blieb dabei unverändert, lediglich das HCII/Thrombin-Verhältnis wurde verändert.

Obwohl die reduzierten und alkylierten HCII-Varianten generell langsamer mit Thrombin reagierten, sind bei unbehandeltem oxidiertem HCIIΔC F195C/P52C mit fixiertem N-Terminus (Abbildung 62 B linker Teil) nur minimale Mengen an HCII-Thrombinkomplexen entstanden, die nur durch eine sehr lange Belichtungsdauer sichtbar gemacht werden konnten. Die reduzierte und alkylierte Form von HCIIΔC F195C/P52C hingegen bildet in Abwesenheit von GAGs sehr viel mehr HCII-Thrombinkomplexe als die oxidierte Form (Abbildung 62 B rechter Teil).

Wie bereits dargestellt, entstand bei der Produktion von rekombinanten HCII-Varianten mit neu eingefügter Disulfidbrücke immer ein, wenn auch sehr geringer Anteil von Molekülen mit geöffneter Disulfidbrücke (siehe E.4.3, E.6.2 und E.8.). Die extrem geringe Menge an HCII-Thrombin-Komplexen im Versuch mit der oxidierten Form von HCIIΔC F195C/P52C läßt Zweifel aufkommen, ob die oxidierte Form überhaupt in der Lage ist, Thrombin zu inhibieren, oder ob die detektierten Komplexe lediglich als Folge der Kontamination mit der reduzierten Form gebildet wurden. Der Versuch zeigte jedoch, daß die Reduktion und Alkylierung von HCIIΔC F195C/P52C zumindest zu einer deutlichen Steigerung der Reaktion mit Thrombin führte. Es erscheint denkbar, daß dies sogar erst durch die Reduktion der Disulfidbrücke möglich wurde.

E.15 Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung

Die bisher durchgeführten Versuche haben qualitative, bzw. semiquantitative Aussagen über den postulierten Aktivierungsmechanismus von HCII durch GAGs geliefert. Um quantitative Aussagen zu erhalten, wurden Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für die reduzierten und alkylierten bzw. unbehandelten Formen von Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat bzw. ohne GAG-Zugabe -wie unter D.2.5.14 beschrieben- bestimmt. Das Material stammte aus stabil transfizierten CHO DUKX B1-Zellen und wurde mittels eines NaCl-Stufengradienten partiell auf einer Heparin-Sepharose-Säule aufgereinigt (siehe E.6.2). Für die Messungen wurde das Material der 300 mM NaCl-Stufe verwendet.

Tabelle 30 auf der nächsten Seite zeigt die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung als Mittelwert der durchgeführten Messungen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Die Daten zeigen, daß sowohl Heparin, als auch Heparin-freies Dermatansulfat die Reaktionsgeschwindigkeit von unbehandeltem Wildtyp-HCII von $1,3 \times 10^5 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in Abwesenheit von GAGs auf $2,8 \times 10^8$ bzw. $2,7 \times 10^8 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ steigerten, was einer Erhöhung der Reaktionsrate um einen Faktor von 2154 bzw. 2077 entsprach. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten lagen damit, obwohl das Material nur partiell aufgereinigt wurde und die Konzentrationsbestimmung über den relativ ungenauen ELISA erfolgte, im Bereich der Werte, die in der Literatur für gereinigtes Plasma-HCII bzw. HCII aus BHK-Zellen veröffentlicht sind¹. Die Werte für die Basisaktivität (ohne GAG-Zugabe) liegen je nach Veröffentlichung² zwischen $2,6 \times 10^4$ und $5,0 \times 10^5 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Für die Heparin-beschleunigte Reaktion liegen die Literaturwerte zwischen $6,3 \times 10^7$ und $5,9 \times 10^8$, für die Dermatansulfat-beschleunigte Reaktion liegen sie zwischen $6,3 \times 10^7$ und $7,2 \times 10^8 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Zu den veröffentlichten Werten muß jedoch noch angemerkt werden, daß

¹ Tollefsen *et al.* 1982, Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989, Han *et al.* 1997, Liaw *et al.* 1999

² Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989, Blinder & Tollefsen 1990, Derechin *et al.* 1990, Ciaccia *et al.* 1997 b, Han *et al.* 1997, Liaw *et al.* 1999, Hayakawa *et al.* 2000 a

HCII jeweils unterschiedlich aufgereinigt wurde, mit unterschiedlichen Konzentrationen an GAGs gearbeitet wurde, die Reaktionstemperatur nicht einheitlich war (RT, 22°C oder 25°C) und daß die photometrische Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten HCII mit drei unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte ($\epsilon = 0,593, 0,91$ oder $1,1 \text{ [ml} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$).

HCII-Variante	ohne GAGs ohne BSA	ohne GAGs 100 µg/ml BSA	Heparin [10 U/ ml] (= 57 µg/ml)	Dermatansulfat heparinfrei [1mg/ml]	Dermatansulfat unbehandelt [1 mg/ml]
Wildtyp-HCII	n=8, t=25min $k_2=1,3 \times 10^5$ s: $\pm 0,4 \times 10^5$	n=8, t=25min $k_2=4,6 \times 10^5$ s: $\pm 0,4 \times 10^5$	n=9, t=5sec $k_2=2,8 \times 10^8$ s: $\pm 0,3 \times 10^8$	n=10, t=5sec $k_2=2,7 \times 10^8$ s: $\pm 0,3 \times 10^8$	n=5, t=5sec $k_2=2,2 \times 10^8$ s: $\pm 0,3 \times 10^8$
Wildtyp-HCII reduziert & alkyliert	n=8, t=25min $k_2=1,4 \times 10^5$ s: $\pm 0,3 \times 10^5$	n=8, t=25min $k_2=6,1 \times 10^5$ s: $\pm 0,3 \times 10^5$	n=9, t=5sec $k_2=3,3 \times 10^8$ s: $\pm 0,4 \times 10^8$	n=10, t=5sec, $k_2=2,9 \times 10^8$ s: $\pm 0,3 \times 10^8$	n=4, t=5sec $k_2=2,9 \times 10^8$ s: $\pm 0,2 \times 10^8$
HCIIΔC F195C/P52C	n=4, t=180min $k_2=n.n.$	n=10, t=5Std $k_2=n.n.$	n=10, t=5Std $k_2=n.n.$	n=10, t=5Std, $k_2=n.n.$	
HCIIΔC F195C/P52C reduziert & alkyliert	n= 6, t=180min $k_2=n.n.$	n=10, t=5Std $k_2=2,0 \times 10^4$ s: $\pm 0,2 \times 10^4$	n=9, t=5sec $k_2=8,8 \times 10^7$ s: $\pm 1,3 \times 10^7$	n=10, t=15sec $k_2=7,4 \times 10^6$ s: $\pm 1,4 \times 10^6$	n=8, t=15sec $k_2=9,0 \times 10^6$ s: $\pm 4,1 \times 10^6$

Tabelle 30: ermittelte Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für reduziertes und alkyliertes bzw. unbehandeltes Wildtyp-HCII und HCIIΔC F195C/P52C. Rot dargestellt ist jeweils die ermittelte Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung (k_2). Einheit der Geschwindigkeitskonstanten: $\text{M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$;
n: Anzahl Parallelmessungen, s: Standardabweichung, t: Komplexierungsdauer, n.n.: nicht nachweisbar.

Die Reduktion und Alkylierung zeigte bei Wildtyp-HCII keinen erkennbaren negativen Effekt, ungleich zu den Ergebnissen in Abschnitt E.13. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß das hier verwendete Material nach der Alkylierung erst dialysiert und anschließend über eine FPLC-Heparin-Sepharose-Säule partiell gereinigt wurde, wohingegen das Material in Abschnitt E.13 mittels Mikrokonzentratoren umgepuffert wurde.

Ein deutlich unterschiedliches Bild ergibt sich bei HCIIΔC F195C/P52C. Mit der unbehandelten oxidierten Form konnte in allen durchgeführten Versuchen, sowohl mit, als auch ohne GAGs, keine Inhibierung der Thrombinaktivität festgestellt werden, trotz Reaktionszeiten von bis zu fünf Stunden. Die Reduktion und Alkylierung von HCIIΔC F195C/P52C versetzte die HCII-Variante in die Lage, Thrombin nach Aktivierung durch GAGs effektiv zu hemmen mit Geschwindigkeitskonstanten von $8,8 \times 10^7$ für die Heparin-katalysierte Reaktion und $7,4 \times 10^6 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion. Die Dermatansulfat-beschleunigte Reaktion der reduzierten und alkylierten Form von HCIIΔC F195C/P52C war gegenüber der reduzierten und alkylierten Form von Wildtyp-HCII allerdings um den Faktor 39 langsamer, die Heparin-beschleunigte Reaktion um den Faktor 3,8. Für die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion wurde unter E.13 bereits gezeigt, daß sich der Austausch von Phe195 gegen Cystein negativ auf die reaktionsbeschleunigende Wirkung durch Dermatansulfat auswirkte. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten unterstützen dieses Ergebnis.

Die Ergebnisse bestätigen somit die bereits unter E.10 und E.13 gezeigte Tatsache, daß die kovalente Fixierung des N-Terminus am Kern des Moleküls die Aktivierung von HCII durch Heparin oder Dermatansulfat verhinderte, die Reduktion der Disulfidbrücke dies wieder ermöglichte.

Eine Faktor für die beschleunigende Wirkung von Heparin und Dermatansulfat auf die Reaktion zwischen reduziertem und alkyliertem HCIIΔC F195C/P52C und Thrombin läßt sich nur grob abschätzen, da es ohne BSA-Zugabe nicht gelungen war, eine Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion in Abwesenheit von GAGs zu ermitteln. Nimmt

man für die reduzierte und alkylierte Form von HCIIΔC F195C/P52C die gleiche Basisaktivität in der Abwesenheit von GAGs an, wie für die reduzierte und alkylierte Form von pWTBiI ($1,4 \times 10^5 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), so ergeben sich als minimale Beschleunigungsfaktoren 629 für die Heparin-katalysierte Reaktion und 53 für die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion. Die tatsächliche Aktivität von reduziertem und alkyliertem HCIIΔC F195C/P52C in der Abwesenheit von GAGs muß jedoch deutlich niedriger liegen, da sich experimentell keine Geschwindigkeitskonstante bestimmen ließ. Die Erhöhung der Reaktionsrate durch die beiden GAGs muß damit ebenfalls deutlich größer sein.

Der Vergleich mit der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten von $2,0 \times 10^4 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für die Reaktion von reduziertem und alkyliertem HCIIΔC F195C/P52C in Abwesenheit von GAGs unter Zugabe von BSA zum Reaktionsansatz ist wissenschaftlich nicht zulässig, da ein BSA-haltiger Reaktionsansatz mit BSA-freien Ansätzen verglichen würde. Nimmt man diesen Wert als groben Anhaltspunkt für die mögliche Basisaktivität von HCIIΔC F195C/P52C in Abwesenheit von GAGs, so würden die oben geschätzten minimalen Steigerungen der Reaktionsraten durch Heparin bzw. Dermatansulfat jeweils um den Faktor 7 größer.

Für die reduzierte und alkylierte Form von HCIIΔC F195C/P52C konnte ohne BSA im Reaktionspuffer, wie bereits erwähnt, keine Reaktion mit Thrombin in Abwesenheit von GAGs nachgewiesen werden, ihr Vorhandensein war jedoch bereits in Abschnitt E.14 gezeigt worden. Der Grund hierfür lag darin, daß die Thrombinaktivität in der ansonsten proteinfreien Lösung zur Aktivitätsmessung in Abwesenheit von HCII bei den verwendeten langen Inkubationszeiten schneller abnahm, als in den proteinhaltigen, nur partiell gereinigten HCII-haltigen Lösungen. Die Zugabe von $100 \mu\text{g/ml}$ BSA als "Schutzprotein" zum Reaktionsansatz stabilisierte die Thrombinaktivität. Für Wildtyp-HCII steigerte sich die Basisaktivität unter diesen Bedingungen allerdings um einen Faktor von bis zu 4,4. Dies überrascht, da in Literaturveröffentlichungen z.T. auch mit BSA-Zugabe gearbeitet wurde¹, ohne daß die Aktivität von HCII in der Abwesenheit von GAGs, daß in diesem Fall allerdings in Insektenzellen produziert wurde, auf Werte über $1 \times 10^5 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ anstieg. Die Ursache hierfür könnte in mangelnder Reinheit des verwendeten BSA, oder der nur partiellen Reinigung von HCII liegen. Die für reduziertes und alkyliertes HCIIΔC F195C/P52C mit BSA-Zugabe erhaltene Basisaktivität in Abwesenheit von GAGs von $2,0 \times 10^4 \times \text{Mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ist daher unter Vorbehalt zu betrachten. Möglicherweise ist sie ebenfalls durch BSA-Zugabe erhöht worden.

Bei der Reaktion von Wildtyp-HCII machte es nur einen geringen Unterschied, ob Heparin-freies Dermatansulfat verwendet wurde, oder unbehandeltes Dermatansulfat, welches noch Heparin-Verunreinigungen enthält². Die Reaktion von reduziertem und alkyliertem HCIIΔC F195C/P52C wurde bei Verwendung von unbehandeltem Dermatansulfat um ca. 20 % schneller. Sofern es sich hierbei nicht um Meßungenauigkeiten der verwendeten Methode handelte, kann der Effekt bei HCIIΔC F195C/P52C mit der verminderten Reaktionsgeschwindigkeit bei der Dermatansulfat-katalysierten Reaktion erklärt werden, die durch Spuren von Heparin in der Dermatansulfat-Lösung stärker beschleunigt wurde.

Die Ungenauigkeit der Meßmethode läßt sich anhand der errechneten Standardabweichungen der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung abschätzen. Die meisten Standardabweichungen liegen unter 15% der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten, jedoch sind auch einige deutlich größere Standardabweichungen zu beobachten.

¹ Ciaccia *et al.* 1997 a

² Teien *et al.* 1976

F Diskussion

Die Diskussion der vorliegenden Arbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

- 1) Theoretische Vorüberlegungen zur Konstruktion einer Disulfidbrücke
- 2) Dreidimensionale Modellierungen von HCII
- 3) Genetische Arbeiten zur Erzeugung und Charakterisierung von rekombinanten HCII-Varianten
- 4) Produktion von rekombinanten HCII-Varianten in tierischen Zelllinien
- 5) Partielle Reinigung von HCII-Varianten
- 6) Strukturelle Charakterisierung von HCII-Varianten
- 7) Funktionelle Charakterisierung von HCII-Varianten
- 8) Resumé
- 9) Ausblick

F.1 Theoretische Vorüberlegungen zur Konstruktion einer Disulfidbrücke

Ziel der Arbeit war es (siehe Teil C), den postulierten Aktivierungsmechanismus¹ von HCII durch Heparin oder Dermatansulfat (siehe B.5.2) weiter zu charakterisieren. Dazu sollte der saure N-Terminus über eine Disulfidbrücke kovalent am Kern des Moleküls fixiert werden. Bei geschlossener Disulfidbrücke dürfte dem Modell nach kein, oder nur ein geringer reaktionsbeschleunigender Effekt durch die beiden GAGs auftreten. Die Reduktion der Disulfidbrücke sollte die Aktivierbarkeit von HCII durch die beiden GAGs wieder herstellen.

Die zum Start der Arbeit vorliegenden Erkenntnisse über den postulierten Aktivierungsmechanismus waren überwiegend durch Einführung von Punktmutationen und Deletionen im HCII oder seinem Reaktionspartner Thrombin erhalten worden und bestätigten den Mechanismus nur indirekt. Sie legten jedoch nahe, daß die beiden sauren Blöcke im N-Terminus von HCII, oder zumindest Teile von ihnen, mit der basischen, GAG-bindenden α -Helix D in der Abwesenheit von GAGs interagieren. Indirekte Hinweise ließen vermuten, daß der N-Terminus und die α -Helix D dabei antiparallel zueinander angeordnet sein könnten. Ferner wurde angenommen, daß der zweite weiter carboxyterminal gelegene saure Block im N-Terminus von HCII mit der Heparin-Bindestelle im HCII interagiert². Zudem war gezeigt worden, daß der saure N-Terminus von HCII und Exosite I von Thrombin nach HCII-Aktivierung durch GAGs miteinander interagieren³ (Zum Modell der allosterischen HCII-Aktivierung siehe B.5.2.).

Ausgehend von diesen Vorgaben schien es sinnvoll, den N-Terminus mit der GAG-bindenden α -Helix D oder ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu verknüpfen. Da HCII bislang noch nicht röntgenkristallographisch charakterisiert ist, war es nicht möglich wie in einigen anderen Arbeiten, die zur Konstruktion neuer Disulfidbrücken auf Röntgenstrukturdaten zurückgreifen konnten, Aminosäuren für den Einbau zweier neuer Cysteinreste auszuwählen, von denen bekannt ist, daß sie in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander stehen.

¹ Ragg *et al.* 1990 a

² Ragg *et al.* 1990 b

³ Hortin *et al.* 1989, Ragg *et al.* 1990 a & b, van Deerlin & Tollefsen 1991, Phillips *et al.* 1993, Sheehan *et al.* 1994

Für die Wahl einer geeigneten Aminosäureposition zum Einbau eines Cysteinrestes im Bereich der GAG-bindenden α -Helix D erschienen drei Ansätze möglich:

- 1) Austausch einer der basischen Aminosäuren der GAG-Bindedomäne. Dem Modell nach stehen diese basischen Aminosäuren über Salzbrücken in direktem Kontakt mit dem sauren N-Terminus. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein an dieser Stelle eingefügter Cysteinrest in der richtigen räumlichen Orientierung zum N-Terminus stände, wäre demnach groß gewesen. Der Nachteil dieses Ansatzes hätte darin bestanden, daß Vorarbeiten gezeigt hatten, daß der Austausch basischer Aminosäuren zu einer verminderten Aktivität von HCII in der Gegenwart von Heparin und/oder Dermatansulfat führte¹. Wie aus den Abbildungen in Abschnitt E.1 zu erkennen ist, ragen bei den HCII-Modellen innerhalb der α -Helix D nur Aminosäuren mit Funktion für die GAG-Bindung zur Oberfläche des Moleküls, so daß keine alternativen Aminosäuren in diesem Bereich zur Verfügung standen. Die einzige Aminosäure ohne bekannte Funktion für die GAG-Bindung, die die richtige Orientierung aufwies, war Asn181 im N-terminalen Bereich der α -Helix D. Eine Verknüpfung über Position 181 im N-terminalen Bereich der α -Helix D, bei der sich bis auf eine Ausnahme alle für die GAG-Bindung wichtigen Aminosäuren C-terminal der Verknüpfung befänden, machte jedoch keinen Sinn, da GAGs bei dieser Verknüpfung wahrscheinlich noch Teile des sauren N-Terminus verdrängen könnten. Es sei angemerkt, daß Holland *et al.*² eine etwas andere Orientierung von N-Terminus und α -Helix D zueinander vorschlugen.
- 2) Austausch von His188 zu Cys188. Ausgangspunkt dieser Überlegung war die Tatsache, daß im AT-Molekül eine Disulfidbrücke zwischen dem N-Terminus und der α -Helix D besteht (Cys8 \leftrightarrow Cys128). Projiziert auf HCII entspräche Cys128 im AT His188 im HCII. Gegen diesen Ansatz sprach allerdings, daß gezeigt wurde, daß der Austausch von His188 gegen Gln oder Lys zu einer starken Abnahme der HCII-Aktivierung durch Dermatansulfat führte³.
- 3) Die gewählte Variante, den N-Terminus mit dem Bereich am C-terminalen Ende der α -Helix D zu verknüpfen. Sie bot den Vorteil, daß keine Aminosäuren mutiert wurden, von denen bekannt ist, daß sie eine Funktion bei der Aktivierung von HCII durch GAGs haben.

Für die Wahl der Position des zweiten neuen Cysteins im Bereich der sauren Blöcke des N-Terminus gab es praktisch keine Hinweise über die mögliche Sekundär- oder Tertiärstruktur dieses Bereichs. Lediglich die Mutation einzelner Aminosäuren oder die Deletion ganzer saurer Blöcke⁴ war beschrieben. Aus diesem Grund wurden drei Positionen gewählt, von denen zwei vor, bzw. direkt am N-terminalen Beginn des ersten sauren Blockes lagen (P52C, G54C) und eine Position direkt vor den zweiten sauren Block (S68C) lokalisiert war. Auf den Austausch von sauren Aminosäuren wurde verzichtet, um die Aktivität von HCII möglichst nicht zu beeinflussen.

HCII besitzt drei natürlich vorkommende Cysteine. Den durchgeführten Modellierungen nach befinden sich diese eher im Inneren des Moleküls (siehe E.1). Ungeachtet dessen ist es denkbar, daß sich zwischen einem der drei natürlich vorkommenden Cysteine und einem der neu in das Molekül eingeführten Cysteine während der Faltung des Proteins im ER eine Disulfidbrücke bildet. Um dies sicher auszuschließen, hätte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden müssen, daß sich die Disulfidbrücke wie beabsichtigt nur zwischen den beiden neu ins Molekül eingeführten Cysteinen gebildet hat. Um dieses Problem von vorn herein zu umgehen, wurden die drei natürlich vorkommenden Codons für Cystein in der HCII-cDNA

¹ Ragg *et al.* 1990 a & b; Blinder & Tollefsen 1990; Whinna *et al.* 1991, Blinder *et al.* 1989; Colwell *et al.* 1999

² Holland *et al.* 2000

³ Ragg *et al.* 1990 b

⁴ Ragg *et al.* 1990 a & b, van Deerlin & Tollefsen 1991

gegen Codons für Serin ausgetauscht. Der Nachweis einer Disulfidbrückenbildung in einer HCII-Variante mit nur zwei Cysteinresten wäre damit ausreichend. Eine Veröffentlichung von Church *et al.*¹ hatte bereits gezeigt, daß die drei Cysteinreste für die Komplexbildung mit Thrombin in Gegenwart von Heparin nicht essentiell sind. Es konnte daher davon ausgegangen werden, daß der Austausch gegen Serinreste keine wesentliche Beeinträchtigung der HCII-Funktion mit sich bringen würde.

F.2 Dreidimensionale Modellierungen von HCII

Da bislang keine Röntgenstrukturdaten von HCII veröffentlicht sind, wurden für die Auswahl einer geeigneten Position für den Einbau eines neuen Cysteins am C-terminalen Ende der α -Helix D dreidimensionale Modelle von HCII mit Hilfe des Swiss Model Servers erstellt (siehe E.1). Zu Beginn der Arbeit waren in der Protein Data Bank (siehe D.1.14) nur Röntgenstrukturdaten von gespaltenen Serpinen und von einem einzigen ungespaltenen Serpin (Ovalbumin aus dem Hühnerei) vorhanden. Die Verwendung von gespaltenen Serpinen zur Modellierung von ungespaltenem HCII war aufgrund der starken Konformationsänderung, die inhibitorische Serpine nach der Spaltung im reaktiven Zentrum durchlaufen (siehe B.4.2), eher ungünstig. Um zumindest ein ungespaltenes Serpin in die Modellierung einzubinden, wurde Ovalbumin mit einbezogen, das allerdings ein nicht-inhibitorisches Serpin ist. Der Schwerpunkt der Modellierungsarbeiten wurde nach den theoretischen Vorüberlegungen darauf gelegt, den C-terminalen Bereich von α -Helix D und dessen Übergang in das β -Faltblatt A möglichst genau zu modellieren. Aus diesem Grund wurden, neben Ovalbumin nur Röntgenstrukturdaten von solchen Serpinen verwendet, die in der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und Strang 2 von β -Faltblatt A dieselbe Anzahl von Aminosäuren aufweisen wie HCII. Anhand dieser Modellierung erschien der Austausch von Phe195 zu Cys sinnvoll, da die SH-Gruppe von Cys195 im Modell dieselbe Orientierung aufwies wie die Reste der basischen GAG-bindenden Aminosäuren.

Die später durchgeführten Modellierungen mit neu veröffentlichten Röntgenstrukturdaten von ausschließlich ungespaltenen Serpinen zeigten, daß die Wahl der Modellierungsvorlagen von Bedeutung für das erhaltene Modell ist. Zwischen dem ersten Modell, das vorwiegend auf der Basis von gespaltenen Serpinen erstellt wurde (Abbildung 35 und Abbildung 36) und den Modellierungen, die nur mit ungespaltenen Serpinen entstanden (Abbildung 37 bis Abbildung 40), gab es einige deutliche Unterschiede. Der offensichtlichste war der N-terminale Bereich der α -Helix D und die Lage von Lys173. Während bei der ersten Modellierung in diesem Bereich ein deutlicher Knick innerhalb der Aminosäurekette zu erkennen war, verlief der Bereich in den späteren Modellierungen fast geradlinig. Ebenso standen die GAG-bindenden Aminosäuren in den späteren Modellierungen räumlich enger zusammen.

Der Wert eines so errechneten Modells sollte jedoch nicht überschätzt werden. Der Versuch, die Position und Orientierung einer einzelnen Aminosäure, hier Cys195, anhand von verwandten Proteinen zu modellieren, birgt erhebliche Unsicherheiten. Die erhaltenen Modelle schienen jedoch gut geeignet, die Lage und Orientierung von etwas größeren Bereichen und den vermutlichen Verlauf der Polypeptidkette zu beurteilen. So erschien es überaus sinnvoll, daß die basischen Reste der GAG-bindenden Aminosäuren alle eine Orientierung zur Oberfläche des Proteins aufwiesen. Ebenso hatten alle Modellierungen gezeigt, daß die Aminosäuren C-terminal von Position 195 zum Moleküllern hin "abtauchten" und damit wenig geeignet erschienen für den Einbau eines der Cysteinreste. Die genaue Lage einer einzelnen Aminosäure dürfte jedoch, trotz der Energieminimierungsalgorithmen der Swiss Model-Software, nur ungenau vorherzusagen sein. Zudem wurde die

¹ Church *et al.* 1987

Bedeutung der Modellierung noch dadurch relativiert, daß die Veröffentlichung von Whinna & Church¹ vermuten ließ, daß sich der α -helikale Anteil im Bereich der Aminosäuren 165 - 195, die an der GAG-Bindestelle beteiligt sind, abhängig vom Vorhandensein oder Fehlen von GAGs ändern könnte.

Sobald die Röntgenstrukturdaten von HCII bekannt sind, wird es interessant sein, die errechneten Modelle mit ihnen zu vergleichen.

F.3 Genetische Arbeiten zur Erzeugung und Charakterisierung von rekombinanten HCII-Varianten

Die durchgeführten genetischen Arbeiten dienen dem Zweck, rekombinante Varianten der bereits im Expressionsvektor pCDM8 vorliegenden HCII-cDNA zu erzeugen und zu charakterisieren. Die Mutagenese erfolgte mit Hilfe der PCR-Mutagenese. Die Mutationen wurden hierbei über mutagene Primer in die entstehenden PCR-Produkte eingeführt. Neben dem Austausch von Codons für die gewählten Aminosäuren wurden mit den mutagenen Primern gleichzeitig stille Indikatormutationen in das PCR-Mutagenese-Produkt eingebaut. Die Indikatormutationen bewirkten eine Änderung des Restriktionsschnittmusters der cDNA, ohne die Aminosäuresequenz am Ort der Indikatormutationen zu ändern. Da die Mutation der Zielcodons und die Indikatormutationen über denselben Primer eingeführt wurden, stellte der Nachweis des veränderten Schnittmusters einen indirekten Beweis für die erfolgreiche Mutagenese dar. Die Größe der PCR-Mutagenese-Produkte wurde so gewählt, daß sich in ihnen Restriktionsschnittstellen befanden, über die die Mutageneseprodukte gegen die entsprechenden Fragmente in der cDNA ausgetauscht werden konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche PCR-Mutagenese-Methoden verwendet. Die PCR-Mutagenese nach Picard *et al.*² (siehe D.2.4.2.1) und die Overlap-Extension-PCR-Mutagenese³ (siehe D.2.4.2.2).

Die Mutagenese nach Picard *et al.* arbeitet mit zwei außen liegenden Primern und einem innen liegenden mutagenen Primer. Die Mutagenese erfolgt mit drei aufeinanderfolgenden PCR-Zyklen, bei denen zuerst ein sogenannter Megaprimer, ein kurzes PCR-Produkt, welches bereits die gewünschte(n) Mutation(en) enthält, erzeugt wird. In den nachfolgenden beiden Schritten wird dieser Megaprimer zum vollständigen PCR-Produkt verlängert und dieses amplifiziert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man mit nur drei Primern auskommt und daß die komplette Mutagenese innerhalb von kurzer Zeit (30 PCR-Zyklen) ohne Reinigungsschritte durchgeführt werden kann. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß sich im Reaktionsansatz die beiden äußeren Primer und das Template befinden, wodurch immer ein gewisser Anteil an nicht mutiertem PCR-Produkt entsteht. Das Ergebnis der Mutagenese ist somit ein Gemisch aus einem Großteil an mutiertem PCR-Produkt und einem geringen Anteil an nicht mutiertem PCR-Produkt.

Die Overlap-Extension-PCR-Mutagenese erzeugt im ersten Schritt in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen aus je einem "normalen" und einem mutagenen Primer zwei PCR-Mutagenese-Produkte, die an ihren Enden zueinander komplementär sind. Die PCR-Produkte der ersten Runde werden aufgereinigt, in einem gemeinsamen Hybridisierungsansatz zum vollständigen Mutagenese-Produkt verlängert und anschließend amplifiziert. Der Nachteil der Methode liegt im deutlich höheren experimentellen und zeitlichen Aufwand, bedingt durch die Aufreinigung der PCR-Produkte aus der ersten Runde, deren Analyse in der Agarose-Gelelektrophorese sowie der anschließenden Hybridisierung und der zweiten PCR-Runde.

¹ Whinna & Church 1994

² Picard *et al.* 1994

³ Ho *et al.* 1989, Ge & Rudolph 1997

Der Vorteil der Methode liegt darin, daß durch die Aufreinigung der 1. Runde PCR-Produkte in der zweiten PCR-Runde nur mutiertes PCR-Mutagenese-Produkt entstehen kann und kein Wildtyp-PCR-Produkt (siehe Abbildung 14). Gegenüber der PCR-Mutagenese nach Picard *et al.* ist diese Methode zwar deutlich aufwendiger, die Reinheit des entstehenden PCR-Mutagenese-Produktes ohne Verunreinigungen durch Wildtyp-PCR-Produkt rechtfertigt jedoch den höheren Aufwand.

Um sicherzustellen, daß die verschiedenen cDNA-Varianten ausschließlich die gewünschten Mutationen enthielten, wurden sie nach Charakterisierung durch Restriktionsspaltungen partiell oder vollständig -wie unter E.3 beschrieben- sequenziert. Die Ergebnisse zeigten, daß die untersuchten cDNAs in den Bereichen, die für die reifen HCII-Varianten codierten, nur die beabsichtigten Mutationen enthielten. Im Bereich des Signalpeptids konnten vier Nucleotide nur als "K" (K=T/G) gelesen werden. Dieser Bereich hatte sich bei allen durchgeführten Sequenzierungen als schwer zu sequenzieren erwiesen, da er offenbar zur Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen neigte. Beim Plasmid pHCIIC F195C/S68C codierten beide möglichen Kombinationen für Gly. Bei pHCIIC traten in diesem Bereich vier "K" auf. Da jedoch sowohl beim Ausgangsplasmid von pHCIIC, dem Vektor pWTBiI, als auch bei den aus pHCIIC hervorgegangenen Plasmiden pHCIIC F195C, pHCIIC F195C/P52C und pHCIIC F195C/G54C die korrekten DNA-Sequenzen gelesen werden konnte, wurde bei diesen nicht eindeutig identifizierten Bereichen auf eine erneute Sequenzierreaktion verzichtet. Sequenzierzweideutigkeiten im 3'-nicht codierenden Bereich der cDNAs, sowie dem Übergang in den pCDM8-Vektor wurden nicht weiter untersucht, da sie für die Zielsetzung der Arbeit ohne Relevanz waren.

F.4 Produktion von rekombinanten HCII-Varianten in tierischen Zelllinien

Für die Produktion der rekombinanten HCII-Varianten wurden ausschließlich tierische Zelllinien verwendet. Auf die Verwendung eines *E. coli*-Expressionssystems wurde verzichtet, da eine in der AG zelluläre Genetik durchgeführte Diplomarbeit¹ gezeigt hatte, daß die Produktion von HCII in *E. coli* mit großen Problemen verbunden war. HCII kann zwar in biologisch aktiver Form in Bakterien produziert werden², aber der allergrößte Teil des produzierten HCII ist biologisch inaktiv und liegt vermutlich in denaturierter Form in sog. "inclusion bodies" vor. Versuche zur Renaturierung dieses HCII scheiterten³. Von dem produzierten HCII banden nur 1,3% an Heparin-Sepharose. Um das Material zur Homogenität aufzureinigen, mußten neben Heparin-Sepharose noch ein Anionen- und ein Kationentauscher verwendet werden. Die Ausbeute betrug nach diesen drei Schritten 0,014%. Dies entsprach 330 µg HCII aus 5 l im Fermenter kultivierter Bakteriensuspension.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden für die transiente Transfektion von COS7-Zellen eingesetzt.

Die Lipofektion (siehe D.2.2.7.1) zeichnet sich dadurch aus, daß nur eine geringe Menge an Plasmid-DNA erforderlich ist (~0,5 µg für ein Zellkulturgefäß mit 8,8 cm² Kultivierungsoberfläche) und daß sie mit hoher Effizienz die Zellen transfizierte. Der experimentelle Aufwand bei dieser Methode ist verhältnismäßig gering. Für eine möglichst hohe Effizienz der Methode sollten die Zellen sich lediglich im logarithmischen Wachstum befinden und eine Konfluenz von ca. 80 % aufweisen. Die Transfektion selbst dauert nur ca. drei Stunden.

¹ Krepulat 1999

² Blinder & Tollefsen 1990, Derechin *et al.* 1990, van Deerlin & Tollefsen 1991, Han *et al.* 1997, Krepulat 1999

³ Krepulat & Böhme, unveröffentlicht

Der große Nachteil der Methode liegt in den hohen Kosten. Die Transfektion der Zellen einer 8,8 cm² großen Zellkulturschale kostet ca. 2,5 Euro. Die Transfektion einer Zellkulturflasche mit einer Oberfläche von 175 cm² hätte demnach ca. 50 Euro gekostet. Die Lipofektion eignete sich deshalb nur für Arbeiten im kleinen Maßstab.

Der Vorteil der Elektroporation (siehe D.2.2.7.2) liegt in den geringen Kosten der Methode. Allerdings ist sowohl der experimentelle Aufwand, als auch der Verbrauch an Plasmid-DNA sehr viel höher. Die Methode benötigt ca. 40 bis 50 µg Plasmid-DNA unabhängig von der Zellzahl. Zudem müssen die Zellen vor der Elektroporation von der Unterlage gelöst werden. Der hohe Verbrauch an Plasmid-DNA rechtfertigte den Einsatz der Elektroporation nur, wenn im größeren Maßstab rekombinantes HCII produziert wurde (Kultivierung in T175-Zellkulturflaschen mit 175 cm² Kultivierungsoberfläche).

Für die Produktion von HCIIΔC F195C/P52C-haltigem Zellkulturüberstand im Liter-Maßstab wurde eine CHO DUKX B1-Zelllinie stabil transfiziert. Die Produktion von mehreren Litern Zellkulturüberstand im transienten COS-Zellsystem mit Hilfe der Elektroporation wäre kaum möglich gewesen, da für eine T175-Zellkulturflasche mit transfizierten Zellen jeweils die Zellen aus zwei bis drei solcher, zu ca. 80% konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen als Ausgangsmaterial benötigt wurden. Bei einem Volumen von ca. 100 ml Zellkulturüberstand je T175-Flasche mit transfizierten Zellen wären für einen Liter Zellkulturüberstand demnach die Zellen von 20 bis 30 T175-Flaschen als Ausgangsmaterial nötig gewesen. Aus diesem Grund wurden CHO DUKX B1-Zellen mit linearisiertem Plasmid pSBR21 stabil transfiziert (pSBR21 enthält das *EcoRI*-Fragment der HCII-cDNA aus pHCIΔC F195C/P52C unter der Kontrolle des pCMV-Promotor, siehe D.2.2.8.1). Als Selektionsmarker für das eukaryotische System diente ein Resistenzgen gegen G418 bzw. Neomycin. Die Selektion transfizierter Zellen konnte erfolgreich mit G418-haltigem Medium erreicht werden, da die Zellen einer nicht-transfizierten Kontrollplatte binnen einer Woche in G418-haltigem Medium abstarben. Im Anschluß wurden Einzelzellklone isoliert und die Zelllinie mit der höchsten Produktion an HCIIΔC F195C/P52C weiterverwendet. In der Produktionsphase mit einer Dauer von vier Tagen wurde serumfreies Medium ohne BSA-Zusatz verwendet, da aus dem FCS stammendes Rinder-HCII nur sehr schwer von humanem HCII zu trennen gewesen wäre, und da Vorversuche gezeigt hatten, daß BSA in der Chemilumineszenz-Immundetektion unspezifische Signale erzeugen kann. Bei der Auswertung der Kultivierungsversuche fiel auf, daß die höchste spezifische Produktivität erst am letzten Tag der Produktionsphase erreicht wurde. Der Grund hierfür dürfte darin gelegen haben, daß die Zellen vor der Produktionsphase in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, um ein möglichst gutes adhärentes Wachstum zu gewährleisten. Die direkte Umstellung auf serumfreies Medium stellte für die Zellen eine Stresssituation dar, an die sie sich vermutlich erst adaptieren mußten, bevor sie effektiv HCII produzieren konnten. Möglicherweise wäre es sinnvoll gewesen über einen längeren Zeitraum zu produzieren. Sofern mit der entstandenen stabil transfizierten Zelllinie weiterhin rekombinantes HCIIΔC F195C/P52C produziert werden soll, wäre es sinnvoll, die Zellen dauerhaft an eine serumfreie Kultivierung zu adaptieren. Die Produktion mit den an serumfreies Medium adaptierten Zellen könnte dann in einem kleinen Fermenter wie dem Superspinner-System durchgeführt werden.

Innerhalb der AG zelluläre Genetik liegt eine stabil transfizierte Wildtyp-HCII-produzierende CHO DUKX B1-Zelllinie vor. Die Herstellung dieser Zelllinie erfolgte über die Kotransfektion zweier Plasmide, die jeweils ein Dihydrofolat-Reduktase-Gen bzw. ein HCII-Gen enthielten¹. Nachfolgend wurde über Selektion und Koamplifikation mit Methotrexat die HCII-Produktion der Zelllinie gesteigert. Die spezifische Produktivität der in dieser Arbeit erzeugten Zelllinie betrug nur ca. 1/3 der Zelllinie, die Wildtyp-HCII produzierte. Man muß diesen Wert

¹ Böhme 2001

jedoch in Relation zum Zeit- und Arbeitsaufwand setzten, der für die Entstehung der beiden Zelllinien benötigt wurde. Die Herstellung der Wildtyp-HCII-produzierenden Zelllinie über Selektion und Koamplifikation mit Methotrexat dauerte ca. ½ Jahr, wohingegen die HCIIAC F195C/P52C-produzierende Zelllinie bereits nach ca. sechs Wochen zur Produktion von rekombinantem HCIIAC F195C/P52C verwendet werden konnte. Die geringere spezifische Produktivität der über G418-Selektion erzeugten Zelllinie erscheint aufgrund des deutlich geringeren Arbeitsaufwands tolerierbar. Eine erneute Selektion von Einzelzellklonen könnte möglicherweise zur Isolierung einer Zelllinie mit höherer spezifischer Produktivität führen.

Der Nachteil der Selektion über G418 lag in den relativ hohen Kosten für das Antibiotikum G418. Die Zelllinie wurde ständig in Gegenwart von G418 kultiviert. In der Zukunft sollte versucht werden die Zellen ohne G418 zu kultivieren und zu testen, ob eine stabile HCII-Produktion auch ohne Selektionsdruck erreicht werden kann.

Eine deutlich höhere HCII-Ausbeute konnte bei der Verwendung von ProCHO4-CDM-Medium erzielt werden. Dieses synthetische, speziell für die Suspensionskultivierung von CHO-Zellen entwickelte Medium ermöglicht es, CHO-Zellen direkt von serumhaltigem Medium an das serumfreie ProCHO4-CDM-Medium zu adaptieren¹. Der Nachteil des Mediums lag darin, daß bei seiner Verwendung ein deutlich höherer Anteil an reduziertem HCIIAC F195C/P52C entstand als bei der Verwendung von DMEM-Medium. Die reduzierte Form von HCIIAC F195C/P52C wurde bei der partiellen HCII-Reinigung über Heparin-Sepharose aufgrund ihrer höheren Affinität zur Heparin-Sepharose angereichert (siehe E.4.3). Die Ursache für den höheren Anteil an reduziertem HCIIAC F195C/P52C bei der Verwendung von ProCHO4-CDM-Medium konnte nicht ermittelt werden, da über die Zusammensetzung des Mediums vom Hersteller auch auf Nachfrage keine Angaben gemacht werden. ProCHO4-CDM-Medium eignete sich aber gut für die kurzfristige serumfreie Produktion von HCII-Varianten, die keine Disulfidbrücken enthalten², für die Produktion von HCIIAC F195C/P52C war es aus oben genanntem Grund ungeeignet.

F.5 Partielle Reinigung von HCII-Varianten

Die durchgeführten partiellen Reinigungen der HCII-Varianten erfolgten über Bindung an Heparin-Sepharose und Elution mit NaCl (siehe E.6). Der wesentliche Aspekt dabei war die Abreicherung vom Fremdproteinen und die Konzentrierung von HCII. Ein sehr großer Teil der im Zellkulturüberstand enthaltenen Proteine band erst gar nicht an die Matrix, was an der sehr hohen UV-Extinktion beim Auftragen der Proben zu erkennen war (nicht dargestellt). Die Tatsache, daß HCII nur partiell gereinigt wurde, ließ sich bereits anhand der Signale des UV-Detektors erkennen (siehe Abbildung 50). Obwohl HCIIAC F195C/G54C, je nachdem ob DTT im Ansatz vorhanden war oder nicht, bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen von der Säule eluierte, waren die Kurven der UV-Signale in ihrem Verlauf fast identisch und zeigten keine Peaks, die klar HCII zugeordnet werden konnten. Das UV-Signal wurde demnach vermutlich zum größten Teil von anderen Proteinen erzeugt.

Die auffälligste Beobachtung bei den partiellen Aufreinigungen der HCII-Varianten mit zwei neu eingeführten Cysteinresten war ihr unterschiedliches Elutionsverhalten von Heparin-Sepharose bei Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von DTT (siehe E.6.1). Das Elutionsverhalten von Wildtyp-HCII war unabhängig von DTT und zeigte ein Maximum bei einer NaCl-Konzentration von 200 - 250 mM. Die drei anderen untersuchten HCII-Varianten mit zwei neu eingeführten Cysteinresten eluierten in Gegenwart von DTT, also bei reduzierten Disulfidbrücken, ebenso wie Wildtyp-HCII mit einem Maximum bei 200 – 250 mM NaCl. In der Abwesenheit von DTT, also bei

¹ persönliche Mitteilung M. Burg

² Gedikli 2001

geschlossener Disulfidbrücke eluierten alle drei Varianten jedoch bereits deutlich früher von der Heparin-Sepharosesäule mit einem Maximum bei 100 - 150 mM NaCl. Dies ist in Übereinstimmung mit dem postulierten Modell nach dem der saure N-Terminus von HCII in Abwesenheit von GAGs intramolekular mit der basischen GAG-Bindestelle interagiert. Wird Wildtyp-HCII auf eine Heparin-Sepharosesäule aufgetragen, so kann das Heparin den sauren N-Terminus von HCII verdrängen und HCII bindet über seine GAG-Bindestelle an die Heparin-Sepharose. Das Modell wird unterstützt durch Daten, die zeigen, daß die Entfernung der sauren Blöcke im N-Terminus von HCII zu deutlich erhöhter Affinität gegenüber Heparin-Sepharose führt¹, und dadurch, daß die Mutation von Aminosäuren, die für die HCII-Aktivierung durch Heparin wichtig sind, zu einer verminderten Affinität gegenüber Heparin-Sepharose führt². Bei geschlossener Disulfidbrücke bleibt der saure N-Terminus von HCII an, bzw. über der GAG-Bindestelle kovalent fixiert. Für Heparin ist dadurch -zumindest partiell- der Zugang zur GAG-Bindestelle blockiert. Dies äußert sich in der deutlich verringerten Affinität gegenüber Heparin-Sepharose.

Bei der Produktion von HCIIΔC F195C/P52C in CHO DUKX B1-Zellen mit Pro CHO4 CDM-Medium entstand neben der Form mit geschlossener Disulfidbrücke auch ein geringer Teil der HCII-Variante mit reduzierter Disulfidbrücke (siehe E.4.3). Bei der partiellen Aufreinigung von bis zu 1,2 l Zellkulturüberstand band dieses reduzierte HCII aufgrund seiner höheren Affinität zur Heparin-Sepharose fester an die Säule als die oxidierte Form, von der bereits beim Auftragen auf die Säule ca. 50 % aufgrund der geringeren Affinität wieder heruntergewaschen wurden. Dies führte zu einer starken Anreicherung der reduzierten Form von HCIIΔC F195C/P52C im Eluat. Das Problem konnte durch Verwendung eines Mediums auf DMEM-Basis weitgehend gelöst werden, da hier sehr viel weniger reduziertes HCIIΔC F195C/P52C entstand. Ein, wenn auch sehr geringer Anteil der reduzierten Form von HCIIΔC F195C/P52C war jedoch auch bei Verwendung von Zellkulturmedium auf DMEM-Basis im partiell gereinigten HCIIΔC F195C/P52C vorhanden (siehe E.6.2). Zur weiteren (vollständigen?) Verminderung der reduzierten Form von HCIIΔC F195C/P52C bei nachfolgenden Arbeiten erscheint es sinnvoll, den Zellkulturüberstand vor dem Auftragen auf die Heparin-Sepharose-Säule mit Kupfer-(II)-Phenanthrolin zu behandeln (siehe E.11), um vorhandenes reduziertes HCII bereits vor dem Auftrag auf die Säule zu reoxidieren.

Die geringe Affinität der HCII-Varianten mit geschlossener Disulfidbrücke gegenüber Heparin-Sepharose gibt zu der Überlegung Anlaß auf Heparin-Sepharose als ersten Reinigungsschritt zu verzichten und gegebenenfalls eine andere Reinigungsstrategie zu entwickeln. Hierbei könnte Heparin-Sepharose eventuell erst bei einem späteren Schritt verwendet werden, in welchem mit kleineren Volumen und einer höheren HCII-Konzentration gearbeitet wird. Denkbar ist, HCII in einem ersten Schritt fraktioniert zu fällen³ und dadurch sowohl zu konzentrieren als auch partiell aufzureinigen.

¹ van Deerlin & Tollefsen 1991, Liaw *et al.* 1999, Böhme 2001

² Ragg *et al.* 1990 a, Blinder & Tollefsen 1990, Whinna *et al.* 1991, Liaw *et al.* 1999

³ Griffith *et al.* 1985 a, Zhang *et al.* 1994

F.6 Strukturelle Charakterisierung von HCII-Varianten

F.6.1 Nachweis der neu ins HCII eingeführten Disulfidbrücken

Der sichere Nachweis der neu in die HCII-Varianten eingeführten Disulfidbrücken war ein essentieller Aspekt dieser Arbeit. Aus diesem Grund wurden zwei voneinander unabhängige Nachweismethoden eingesetzt: Der Nachweis aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität in der SDS-PAGE unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen und der Nachweis unterschiedlich großer BrCN-Spaltprodukte ebenfalls unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen (siehe E.7).

Die erhöhte elektrophoretische Mobilität von Proteinen mit Disulfidbrücken unter nicht reduzierenden Bedingungen ist eine in der Literatur häufig beschriebene Methode zum Nachweis von intramolekularen Disulfidbrücken¹. Ebenso wurde beschrieben, daß die Größe der Schleife, die durch die Disulfidbrücke gebildet wird, Einfluß auf die elektrophoretische Mobilität hat. Im Abschnitt E.7.1 konnte für alle drei HCII-Varianten mit zwei neu eingeführten Cysteinresten eine erhöhte elektrophoretische Mobilität unter nicht reduzierenden Bedingungen gezeigt werden. Dies stellte jeweils einen Beweis für das Vorhandensein einer intramolekularen Disulfidbrücken dar. Die beiden HCII-Varianten HCIIΔC F195C/P52C und HCIIΔC F195C/G54C zeigten dabei unter nicht reduzierenden Bedingungen eine gleich große elektrophoretische Mobilität. Dies überraschte nicht, da die durch die Disulfidbrücken gebildeten Schleifen mit Größen von 143 und 141 Aminosäuren fast gleich groß waren. Ein wenig überraschend war die Tatsache, daß HCIIΔC F195C/S68C mit einer Schleifengröße von 127 Aminosäuren sich in der elektrophoretischen Mobilität doch recht deutlich von den beiden anderen Varianten unterschied.

Als zweite Nachweismethode wurden eine BrCN-Spaltung der HCII-Varianten durchgeführt (siehe E.7.2). Die Präsenz von zwei Methioninresten innerhalb der durch die Disulfidbrücke gebildeten Schleife führte dazu, daß unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE die Schleife in zwei nahezu gleich große BrCN-gespaltene Fragmente zerlegt wurde. Unter nicht reduzierenden Bedingungen blieben diese beiden Fragmente über die Disulfidbrücke verbunden und liefen somit als eine gemeinsame Bande. Die unterschiedlichen Bandenmuster unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen bewiesen ebenfalls die Existenz der gebildeten intramolekularen Disulfidbrücken in den drei Varianten. Das Fehlen weiterer Banden zeigte zudem, daß die Spaltung weitgehend vollständig erfolgt war. Die Tatsache, daß die beiden großen Fragmente apparente Molekulargewichte zeigten, die deutlich oberhalb der errechneten Größen lagen war etwas überraschend. Es ist jedoch in der Literatur beschrieben worden, daß das apparente Molekulargewicht in der SDS-PAGE oft nicht mit dem anderweitig bestimmten tatsächlichen Molekulargewicht übereinstimmt². Zudem weist eines der Fragmente noch eine N-Glykosylierung auf, die sich auch auf das Laufverhalten auswirkt. Eine große Überraschung stellte die Tatsache dar, daß alle drei Varianten mit zwei neu in das Molekül eingeführten Cysteinresten eine intramolekulare Disulfidbrücke gebildet hatten, obwohl die Positionen der neu eingebauten Cysteine im N-Terminus von HCII bis zu 16 Aminosäuren (Cys52 ↔ Cys68) voneinander entfernt lagen. Bei der Konstruktion von HCII-Varianten waren drei verschiedene Positionen für den Einbau des zweiten Cysteins in N-Terminus gewählt worden, weil es keine Erkenntnisse über die mutmaßlichen Interaktionen zwischen dem sauren N-Terminus und der basischen GAG-Bindestelle gab. Die zur Verfügung stehenden Daten ließen vermuten, daß der zweite, weiter C-terminal gelegene

¹ Pollit & Zalkin 1983, Wells & Powers 1986, Pantoliano *et al.* 1987, Matsumura & Matthews 1991, Tan *et al.* 1996, Lehle *et al.* 1996, Hopkins *et al.* 1997, Uchida *et al.* 1997

² Weber *et al.* 1971

saure Block mit der Heparin-Bindestelle interagiert, wohingegen der erste saure Block eine wichtigere Funktion bei der Interaktion mit Thrombin-Exosite I hat¹ (siehe auch B.5.2). Die drei verschiedenen Positionen im N-Terminus waren ausgewählt worden mit der Überlegung, daß zumindest eine der drei Positionen bei der Interaktion zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus in die räumliche Nähe von Cys195 gelangen sollte und über sie eine Disulfidbrücke ausgebildet werden könnte.

Zwei Erklärungsansätze scheinen zur Lösung dieses Phänomens denkbar:

1) Die entstandene Disulfidbrücke war jeweils die Folge einer unnatürlichen Zwangsfaltung der HCII-Varianten. Bei der kotranslationalen Faltung in ER wurden der N-Terminus und die GAG-Bindestelle durch die Ausbildung der Disulfidbrücke in eine unnatürliche Konformation gezwängt, die es im Wildtyp-Molekül nicht gibt. Die Experimente zur Reoxidation von HCIIΔC F195C/P52C (siehe F.6.2) sprechen zumindest bei dieser HCII-Variante dagegen. Mit den anderen HCII-Varianten wurden keine Reoxidationsversuche durchgeführt.

2) Wenn die Ausbildung der Disulfidbrücken in HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C nicht die Folge von unnatürlichen Zwangsfaltungen war, scheint es denkbar, daß die Interaktion zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus flexibler ist, als bisher angenommen. Dem bestehenden Modell nach beruht die Interaktion der beiden Molekülbereiche wesentlich auf der Interaktion zwischen sauren und basischen Seitenketten. Die hohe Dichte von sowohl basischen, als auch sauren Resten läßt es durchaus möglich erscheinen, daß sich alternative Salzbrücken zwischen positiv und negativ geladenen Domänen bilden können, d. h. es gibt keine fest definierten Bindungspartner. Die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken über alternative Positionen innerhalb der Polypeptidkette des N-Terminus würde dann dafür sprechen, daß es bei der Interaktion zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus auch *in vivo* alternative Konformationen auf ähnlichen Energieniveaus geben kann.

F.6.2 Reoxidation von HCIIΔC F195C/P52C *in vitro*

Aus theoretischer Sicht erschien es denkbar, daß die Ausbildung der Disulfidbrücke die HCII-Varianten mit neu eingefügten Cysteinresten in eine unnatürliche Konformation zwängte, in welcher N-Terminus und GAG-Bindestelle in einer Konformation zueinander standen, in der sie sich im Wildtyp-HCII nicht befinden. Eine Reduktion der Disulfidbrücke würde den Molekülen die Möglichkeit geben, sich in die korrekte biologisch aktive Konformation umzufalten, welche in der Lage wäre, Thrombin -wie unter E.10, E.13 und E.15 gezeigt- zu inhibieren. In zahlreichen Literaturveröffentlichungen wurde jedoch gezeigt, daß falsch gefaltete, denaturierte Proteine meist gar nicht aus der Zelle sezerniert werden, sondern im Komplex mit Chaperonen wie BiP/GRP78 oder im Calnexin-Calretikulin-Kreislauf über Rückhalte-, bzw. Rücktransportmechanismen im ER gehalten, bzw. aus dem Golgi Apparat dorthin zurücktransportiert werden². Auf experimenteller Ebene konnte gezeigt werden, daß reduziertes biologisch aktives HCIIΔC F195C/P52C mit Hilfe von Kupfer-(II)-Phenanthrolin oder oxidiertem Glutathion *in vitro* zu ca. 90% reoxidiert werden konnte. Es sei angemerkt, daß die Versuchsbedingungen zur Reoxidation nur einmal optimiert wurden. Eine weitere Optimierung der Konzentrationen und/oder Zeiten könnte zu noch weitergehenderer Reoxidation führen. Es erscheint daher sehr unwahrscheinlich, daß denaturiertes, in eine unnatürliche Konformation gezwungenes HCIIΔC F195C/P52C durch Reduktion eine

¹ Ragg *et al.* 1990, van Deerlin & Tollefsen 1991, Wemhoff & Church 1999

² Hurlley *et al.* 1989, Hammond & Helenius 1994, Ellgaard & Helenius 2001, Helenius 2001

Konformationsänderung zu aktivem, anders gefaltetem HCII durchläuft, und daß dieses umgefaltete HCII dann wieder reoxidiert werden kann. Aus diesem Grund scheint es plausibel, daß HCIIΔC F195C/P52C sich auch mit geschlossener Disulfidbrücke in einer weitgehend natürlichen Konformation befindet, die sich nicht wesentlich von der natürlichen Faltung im biologisch aktiven Wildtyp-HCII unterscheiden kann. Andernfalls wäre eine Reoxidation der reduzierten Disulfidbrücke wahrscheinlich nicht möglich gewesen, da die freien Cysteinreste nach einer signifikanten Umfaltung des Moleküls nicht mehr in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zueinander gestanden hätten, die für die Ausbildung einer Disulfidbrücke notwendig ist¹.

Die bisherigen Veröffentlichungen hatten die Interaktion des sauren N-Terminus und der basischen GAG-Bindestelle nur indirekt angenommen, da Mutationen in einem der beiden Partner die Affinität gegenüber Heparin-Sepharose beeinflusste, und da sich dadurch auch die reaktionsbeschleunigende Wirkung von Heparin bzw. Dermatansulfat änderte². Diese Arbeit liefert erstmals einen direkteren Hinweis dafür, daß der saure N-Terminus und die basische GAG-Bindestelle auch *in vivo* in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander stehen können.

Mit den beiden HCII-Varianten HCIIΔC F195C/G54C und HCIIΔC F195C/S68C wurden, wie bereits erwähnt, keine Reoxidationsversuche durchgeführt, so daß für sie nicht ausgeschlossen werden kann, daß sie durch die Disulfidbrücken in eine unnatürliche Konformation gezwängt wurden. Die Durchführung dieser Reoxidationsversuche würde auch einen Hinweis darauf geben, ob -wie unter F.6.1 diskutiert- flexible Interaktionen zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus möglich sind.

F.6.3 Dimerbildung

Die Bildung von HCII-Dimeren oder gemischten Dimeren aus HCII und einem anderen Molekül, wäre eine andere Möglichkeit gewesen, welche zu falschen Interpretationen hätte führen können. Dimere wären wahrscheinlich biologisch inaktiv, die Reduktion der verbindenden Disulfidbrücke(n) hätte die biologische Aktivität wieder herstellen können. Wie in Abschnitt E.8 gezeigt wurde, ist der Anteil an HCII-Dimeren gering. Ob es sich um HCII-Homodimere oder Heterodimere, beispielsweise mit Transferrin handelt, wurde nicht untersucht. Hierzu könnten Western-Blot Experimente durchgeführt werden, bei denen Antikörper gegen den möglichen zweiten Dimer-Partner eingesetzt werden müßten.

F.7 Funktionelle Charakterisierung von HCII-Varianten

F.7.1 Die Rolle der natürlich vorkommenden Cysteine

HCII besitzt drei natürlich vorkommende Cysteinreste in den Positionen 273, 323 und 467. Die Position dieser drei Cysteine ist in allen bislang untersuchten HCII-Sequenzen aus verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Kanninchen, Huhn, Frosch) konserviert³. Church *et al.*⁴ hatten durch chemische Modifikation dieser Reste gezeigt, daß sie im humanen HCII nicht essentiell sind für die Inhibierung von Thrombin durch HCII in Gegenwart von Heparin. Der Austausch der drei natürlich vorkommenden Cysteine für Funktionsanalysen wurde bislang nicht beschrieben. Die in dieser Arbeit entstandene HCII-Variante HCIIΔC

¹ Thornton 1981, Richardson 1981, Matsumura *et al.* 1989

² Ragg 1990 a, van Deerlin & Tollefsen 1991, Liaw *et al.* 1999

³ Ragg 1986, Westrup & Ragg 1994, Zhang *et al.* 1994, Sheffield *et al.* 1994, Colwell & Tollefsen 1998

⁴ Church *et al.* 1987

bestätigt qualitativ die Aussagen von Church *et al.* Sofern es sich bei der gefundenen Konservierung der drei Cysteinreste nicht um zufällige Sequenzhomologie handelt, stellt sich die Frage nach den Grund der Konservierung und ihrer möglichen Funktion. Tyagi¹ hatte am Beispiel von α_1 -Antitrypsin gezeigt, daß es über einen freien Cysteinrest nach Konformationsänderung ein gemischtes Disulfid mit seiner Zielprotease Elastase bildet. Für HCII sind hierüber bislang keine Erkenntnisse veröffentlicht worden. Eine Cystein-freie Mutante könnte im Vergleich zu Wildtyp-HCII einen Ansatz bieten, die mögliche Ausbildung gemischter Disulfide zwischen HCII und Thrombin zu untersuchen.

F.7.2 HCII-Thrombin-Reaktion in der Abwesenheit von Glykosaminoglykanen

Bei allen untersuchten HCII-Varianten, mit Ausnahme der oxidierten Form von HCII Δ C F195C/P52C, konnte in der Abwesenheit von GAGs eine Komplexbildung zwischen HCII und Thrombin bei einem molaren Inhibitor/Thrombin-Verhältnis von 2:1 sowohl für die unbehandelte als auch für die reduzierte und alkylierte Form der Inhibitoren nachgewiesen werden (siehe E.14). Die Menge an gebildeten HCII-Thrombin-Komplexen zeigte dabei deutliche Unterschiede. Die stärkste Komplexbildung war bei Wildtyp-HCII und der unbehandelten Form von HCII Δ C zu beobachten, deutlich schwächer war sie bei HCII Δ C F195C und der reduzierten und alkylierten Form von HCII Δ C F195C/P52C. Generell war, mit Ausnahme von HCII Δ C F195C/P52C zu beobachten, daß die reduzierte und alkylierte Form der HCII-Varianten langsamer mit Thrombin reagierte, als die unbehandelte Form. Da von diesem Phänomen auch die Cystein-freie Mutante HCII Δ C betroffen war, kann von einer unspezifischen, auch in der Literatur beschriebenen Alkylierung anderer Reste wie Methionin, Histidin und Lysin ausgegangen werden², die zu einem partiellen Aktivitätsverlust führte.

Im Abschnitt E.13 war gezeigt worden, daß die Mutation F195C zu einer Verlangsamung der Reaktion zwischen HCII und Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat führte. Interessanterweise reagierten auch in dieser Versuchsreihe in Abwesenheit von GAGs die beiden HCII-Varianten mit der Mutation F195C deutlich langsamer, als die beiden Varianten ohne diese Mutation. Die Ungenauigkeit der Methode (siehe dazu F.7.4), und die sehr langen Belichtungszeiten lassen jedoch hierüber keine verlässlichen Aussagen zu. Es wäre allerdings interessant dies näher zu untersuchen.

Auffälligste Beobachtung bei der Komplexierung in Abwesenheit von GAGs war das Verhalten der oxidierten Form von HCII Δ C F195C/P52C. Bei einem molaren Inhibitor/Thrombin-Verhältnis von 2:1 konnte keine Komplexbildung nachgewiesen werden. Eine extrem schwache HCII-Thrombin-Komplexbande konnte erst bei einem HCII/Thrombin-Verhältnis von 1:2 und einer ECL[®]-Hyperfilm-Belichtungsdauer von 35 Minuten detektiert werden. (Die HCII-Konzentration war bei diesem zweiten Versuch gleich geblieben, lediglich die Menge an Thrombin war vervierfacht worden.) Entgegen dem allgemeinen Trend war die Reaktion der unbehandelten Form jedoch um ein vielfaches schwächer, als bei der reduzierten und alkylierten Form (siehe Abbildung 62). Da sich bei der Produktion der HCII-Varianten mit neu eingefügten Disulfidbrücken immer ein, wenn auch geringer Anteil an Molekülen mit reduzierten Disulfidbrücken bildete (siehe E.4.3, E.6.2 und E.8.), stellt sich die Frage, ob HCII Δ C F195C/P52C mit geschlossener Disulfidbrücke überhaupt in der Lage ist mit Thrombin Komplexe zu bilden, oder ob die detektierten HCII-Thrombinkomplexe ausschließlich durch die Kontamination mit dem geringen Anteil an reduzierten Molekülen gebildet wurden.

¹ Tyagi 1996

² Lundell & Scheitmüller 1999

Die erhaltenen Ergebnisse belegen jedoch klar, daß die Ausbildung der Disulfidbrücke bei HCIIAC F195C/P52C einen stark negativen Einfluß auf die Fähigkeit der HCII-Variante hat mit Thrombin in der Abwesenheit von GAGs SDS-stabile Komplexe zu bilden.

Drei Erklärungsmöglichkeiten erscheinen für diese Beobachtung vorstellbar:

1) Die oxidierte Form von HCIIAC F195C/P52C wurde bei der kotranslationalen Ausbildung der Disulfidbrücke in eine unnatürliche Konformation gezwängt, die keine oder nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber Thrombin besitzt. Gegen diese Argumentation spricht die Tatsache, daß sich die reduzierte Disulfidbrücke -wie unter E.11 beschrieben- *in vitro* reoxidieren ließ. Der Versuch spricht eher dafür, daß Cys52 im sauren N-Terminus und Cys195 am C-terminalen Ende der GAG-Bindestelle sowohl in der reduzierten biologisch aktiven Form als auch in der oxidierten Form in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander stehen können und daß die oxidierte Form sich in ihrer Konformation nicht wesentlich von der reduzierten Form unterscheiden kann. Für die HCII-Varianten HCIIAC F195C/P54C und HCIIAC F195C/S68C wurden keine Reoxidationsexperimente durchgeführt, so daß für sie eine unnatürliche Konformation nicht ausgeschlossen werden kann.

2) Die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen Cys195 und Cys52 hat über eine Konformationsänderung eine Auswirkung auf die reaktive Schleife und das reaktive Zentrum von HCII. Ausgangspunkt dieser Überlegung sind Erkenntnisse, die über die Aktivierung von AT durch Heparin gewonnen wurden. Die Bindung von Heparin an die Heparin-Bindestelle von AT (siehe hierzu auch B.5.2) führt zu Konformationsänderungen, die neben dem Bereich der GAG-Bindestelle auch das 30 Angström entfernte reaktive Zentrum von AT betreffen. Drei Vorgänge sind dabei von wesentlicher Bedeutung¹: A) Die Bildung einer neuen, aus nur einer Windung bestehenden α -Helix P zwischen α -Helix C und D. B) Die Verlängerung der α -Helix D am carboxyterminalen Ende um sechs Aminosäuren bzw. 1,5 Windungen. C) Eine Konformationsänderung der reaktiven Schleife von einer partiellen Insertion in das β -Faltblatt A zur vollen Exposition und Präsentation des P₁-Argininrestes. Die Bedeutung der Aminosäuren in der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und Strang 2 von β -Faltblatt A (S2A) wurde durch die Arbeit von Meagher *et al.*² verdeutlicht. Bereits die Deletion einer einzigen Aminosäure (Ala134) in diesem Bereich, ebenso wie die Deletion größerer Bereiche (Ala134 bis Ser137), hatte starke negative Auswirkungen auf die Aktivierung von AT durch Heparin. Die Mutation betraf dabei nicht die Basisaktivität in Abwesenheit von Heparin oder die korrekte Faltung des Moleküls, sondern die Übertragung der Konformationsänderung auf das reaktive Zentrum. Die Autoren gelangten zu dem Schluß, daß nicht die Länge der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und S2A der entscheidende Faktor ist, sondern die präzise Interaktion zwischen Aminosäureresten in dieser Region und anderen Resten, die an der Konformationsänderung von AT bei der Aktivierung durch Heparin beteiligt sind. Übertragen auf HCII würde Ala134 im AT Asn194 im HCII entsprechen³. Die Bedeutung der Region C-terminal von α -Helix D im AT läßt die Vermutung zu, daß diese Region auch im HCII eine Funktion für die Aktivität des Moleküls haben könnte. Die Mutation F195C läge damit genau in diesem kritischen Bereich. Eine kovalente Fixierung am N-Terminus könnte damit möglicherweise auch einen Einfluß auf das reaktive Zentrum von HCII haben und die Basisaktivität in der Abwesenheit von GAGs zumindest stark vermindern, wenn nicht sogar ganz ausschalten. Denkbar scheint in diesem Zusammenhang auch, daß die Mutation F195C einen Einfluß auf die Aktivierung von HCII durch Dermatansulfat hat (siehe dazu F.7.4).

¹ Jin *et al.* 1997, Skinner *et al.* 1997, Huntington *et al.* 2000 b

² Meagher *et al.* 2000

³ Huber & Carrell 1989

3) Für die Basisaktivität von HCII in der Abwesenheit von GAGs ist nicht ausschließlich die reaktive Schleife von Bedeutung, sondern ebenfalls der saure N-Terminus. Es erscheint durchaus möglich, daß sich in einem geringen Teil der HCII-Moleküle der saure N-Terminus spontan und ohne Beteiligung von GAGs aus seiner intramolekularen Interaktion mit der GAG-Bindestelle löst und mit Exosite I von Thrombin interagiert. Dieser geringe Anteil von deutlich "reaktiverem" HCII könnte wesentlich zur Basisaktivität von HCII in der Abwesenheit von GAGs beitragen. Ausgehend von den Erkenntnissen über die Aktivierung von AT durch Heparin scheint es zusätzlich ebenso denkbar, daß die Konformationsänderung des N-Terminus von HCII einen Einfluß auf das reaktive Zentrum ausüben kann. Eine kovalente Fixierung des N-Terminus würde diesen Effekte unterbinden, was zu der beobachteten minimalen Basisaktivität von HCII führen würde.

Ein Ansatz zur Lösung dieser Fragen könnte sein, die Reaktion zwischen HCII und Chymotrypsin, die nicht durch GAGs stimuliert wird, für Wildtyp-HCII und HCII Δ C F195C/P52C näher zu untersuchen. Sollte die kovalente Fixierung des N-Terminus von HCII einen Einfluß auf die reaktive Schleife haben, könnte sich dies über eine veränderte Reaktionsgeschwindigkeit zwischen HCII und Chymotrypsin manifestieren.

F.7.3 Qualitative Versuche zur Komplexierung der HCII-Varianten mit Thrombin in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat

Zur qualitativen Untersuchung der Komplexierung von HCII-Varianten mit Thrombin in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat wurde die Reaktion in An- oder Abwesenheit von DTT durchgeführt (siehe E.10). Mit Ausnahme der drei HCII-Varianten mit zwei neu in das Molekül eingefügten Cysteinresten waren alle untersuchten HCII-Varianten unabhängig vom Oxidationszustand in der Lage, mit Thrombin in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat SDS-stabile Komplexe zu bilden. Bei den HCII-Varianten HCII Δ C F195C/P52C, HCII Δ C F195C/G54C und HCII Δ C F195C/S68C konnte bei geschlossener Disulfidbrücke, auch bei optimalen Konzentrationen von Heparin oder Dermatansulfat bei einer Komplexierungszeit von 20 Minuten keine Komplexbildung mit Thrombin detektiert werden. (Es sei angemerkt, daß die Komplexierung zwischen Wildtyp-HCII oder reduziertem und alkyliertem HCII Δ C F195C/P52C und Thrombin im Versuch E.13 teilweise bereits nach 75 Sekunden weitgehend abgeschlossen war.) Die Reduktion der Disulfidbrücke stellte die Fähigkeit der HCII-Varianten wieder her, Thrombin in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat effektiv zu inhibieren.

Die Ergebnisse unterstützen das Modell der HCII-Aktivierung durch GAGs nach dem der N-Terminus von HCII und seine Positionsänderung gegenüber dem Kern des Moleküls eine kritische Rolle für den aktivierenden Effekt von Heparin bzw. Dermatansulfat auf die Reaktion mit Thrombin hat. Zusammen mit den in Abschnitt E.11 erhaltenen Daten, die dafür sprechen, daß sich der N-Terminus der HCII-Variante HCII Δ C F195C/P52C auch *in vivo* in räumlicher Nähe zur GAG-Bindestelle befindet, unterstützen die Ergebnisse die Modellvorstellung, daß GAGs ihre reaktionsbeschleunigende Wirkung über eine Positionsänderung des sauren N-Terminus gegenüber dem Kern des Moleküls vermitteln. Bisherige Veröffentlichungen haben gezeigt, daß der N-Terminus von HCII mit der Exosite I von Thrombin interagiert¹. Die in dieser Arbeit durchgeführte kovalente Fixierung des N-Terminus verhinderte eine Positionsänderung des N-Terminus und unterband die reaktionsbeschleunigende Wirkung der beiden GAGs.

¹ Hortin *et al.* 1989, Ragg *et al.* 1990 a & b, van Deerlin & Tollefsen 1991, Phillips *et al.* 1993, Sheehan *et al.* 1994, Myles *et al.* 1998

Die Tatsache, daß bei geschlossener Disulfidbrücke sowohl bei An-, als auch bei Abwesenheit von GAGs keine oder nur eine minimale Aktivität gegenüber Thrombin detektiert werden konnte, läßt ergänzend zur Exposition des N-Terminus ein Modell zu, nachdem der N-Terminus einen Einfluß auf das aktive Zentrum von HCII haben könnte. Sofern die Ausbildung der Disulfidbrücke nicht zu einer partiellen oder vollständigen Inaktivierung des reaktiven Zentrums beigetragen hat (siehe auch F.7.2), scheint es möglich, daß die Interaktion zwischen N-Terminus und GAG-Bindestelle sich auch auf das reaktive Zentrum von HCII auswirkt. Die Positionsänderung des N-Terminus bei der Aktivierung durch GAGs könnte demnach zu einer Konformationsänderung der reaktiven Schleife führen, die mit höherer Effektivität Thrombin inhibieren könnte. Umgekehrt würde die Interaktion zwischen GAG-Bindestelle und N-Terminus zu einer ungünstigeren Konformation des reaktiven Zentrums führen.

F.7.4 Semiquantitative Charakterisierung der HCII-Thrombin-Reaktion in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen

Um abzuschätzen, ob und in wieweit die einzelnen eingeführten Mutationen sich auf die Inhibition von Thrombin durch die verschiedenen HCII-Varianten in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat auswirkten, wurden die reduzierten und alkylierten bzw. die unbehandelten Formen der HCII-Varianten zeitabhängig mit Thrombin komplexiert. Die Auswertung erfolgte dadurch, daß nach definierten Zeitpunkten Aliquots der Komplexierungsansätze entnommen wurden und der prozentuale Anteil der entstandenen HCII-Thrombin-Komplexe gegenüber dem Anteil an nicht komplexiertem HCII nach Western-Blot und Chemilumineszenz-Detektion auf den entwickelten ECL[®]-Hyperfilmen densitometrisch bestimmt wurde (siehe E.13). Die erhaltenen Daten bestätigten die bereits diskutierten qualitativen Ergebnisse, nachdem der N-Terminus von HCII eine wichtige Rolle für die Aktivierung von HCII durch GAGs hat. HCII Δ C F195C/P52C zeigte bei geschlossener Disulfidbrücke keine meßbare Reaktion mit Thrombin. Die Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücke überführte die HCII-Variante in die Lage Thrombin effektiv zu komplexieren. Die anderen HCII-Varianten zeigten in der Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat eine Komplexbildung mit Thrombin, die weitgehend unabhängig vom Reduktion und Alkylierung war.

Ein unerwartetes Ergebnis war die Auswirkung der Mutation F195C. Neben HCII Δ C F195C und HCII Δ C F195C/P52C zeigte auch HCII F195C, eine HCII-Variante, welche als einzige Mutation den Austausch von Phe195 gegen Cys besitzt, in Gegenwart von Dermatansulfat eine verlangsamte Reaktion mit Thrombin. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß Phe195 eine Funktion bei der Dermatansulfat-beschleunigten Reaktion zwischen HCII und Thrombin hat. Es sei angemerkt, daß die Heparin- und Dermatansulfat-Bindestellen nur partiell überlappen, und daß zumindest Teile der Dermatansulfat-Bindestelle sich weiter am C-terminalen Ende der α -Helix D, also in der Nachbarschaft von Phe195 befinden (siehe B.5.2).

Zwei Funktionen des Phenylalaninrestes erscheinen denkbar:

- 1) Phe195 ist direkt an der Interaktion mit Dermatansulfat beteiligt. Dies erscheint jedoch aufgrund des hydrophoben Charakters der Seitenkette und des stark anionischen Charakters von Dermatansulfat weniger wahrscheinlich.
- 2) Phe195 hat eine Funktion bei der Umsetzung der reaktionsbeschleunigenden Wirkung von Dermatansulfat. Die große, sperrige und hydrophobe Seitenkette der Phenylalanins könnte hier einen Einfluß auf die dreidimensionale Konformation der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und Strang 2 im Faltblatt A (S2A) oder für die korrekte Konformation der Dermatansulfat-Bindestelle haben. Für AT wurde -wie bereits unter F.7.2 beschrieben- gezeigt, daß der Molekülbereich zwischen α -Helix D und S2A eine wichtige Funktion bei der

Umsetzung der Heparin-induzierten Konformationsänderung im AT hat¹. Zudem wurde für AT postuliert, daß weniger die Länge der Schleife in diesem Bereich, als vielmehr die Interaktion definierter Reste untereinander für die Umsetzung der Konformationsänderung von Bedeutung sein könnte. Der signifikant negative Einfluß der Mutation F195C, welche genau in dieser Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und S2A liegt, auf die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion von HCII mit Thrombin läßt eine ähnliche Bedeutung dieses Molekülbereichs auch für HCII möglich erscheinen. Interessanterweise ist die C-terminale Hälfte der α -Helix D und der Übergang in S2A bei allen bislang untersuchten HCII aus verschiedenen Spezies² (Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen, Huhn, Frosch) auf einer Länge von 17 Aminosäuren absolut identisch. Alternativ könnte Phe195 auch eine Funktion für die Freisetzung des N-Terminus haben. Unterstützt werden diese Überlegungen durch die Veröffentlichung von Liaw *et al.*³, die anhand von Fluoreszenzmarkierungsexperimenten gezeigt haben, daß Dermatansulfat in einem größeren Ausmaß Konformationsänderungen im HCII induziert als Heparin.

Die Bedeutung von Phe195 ist in der Literatur bislang nicht erwähnt worden. Es wäre interessant zu untersuchen, in welcher Art und Weise Phe195 für die HCII-Aktivierung durch Dermatansulfat von Bedeutung ist, beispielsweise indem anhand der Mutation zu Tyr oder Trp untersucht wird, ob die Größe der Seitenkette von Relevanz ist, oder ob die Deletion der Aminosäure, ähnlich wie beim AT die Deletion von Ala134, die Aktivierung durch GAGs stark negativ beeinflusst.

Die erhaltenen Ergebnisse sind, bedingt durch die verwendeten Methoden, mit einem gewissen Grad an Ungenauigkeit behaftet:

Die Bestimmung der HCII-Konzentration erfolgte semiquantitativ über Western-Blots gegen eine Verdünnungsreihe aus Standard-Humanplasma als Standard. Der Effekt der Ungenauigkeit bei der Konzentrationsbestimmung ist jedoch nicht so stark, da zur Auswertung das Verhältnis von komplexiertem HCII zu nicht komplexiertem HCII bestimmt wurde.

Die Hauptquelle der Ungenauigkeit dürfte in der nicht kontrollierbaren Effizienz des Western-Blots und bei der Entwicklung der ECL[®]-Hyperfilme liegen. Um standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden die ECL[®]-Hyperfilme bei allen Versuchen einheitlich lange belichtet. Eine Schwäche der verwendeten Methode ist jedoch, daß es keine lineare Beziehung zwischen Belichtungsdauer und Schwärzung der ECL[®]-Hyperfilme gibt. Bei längerer Belichtung nehmen schwache Banden weiterhin an Intensität zu, während der Röntgenfilm über starken Banden bereits nach kurzer Zeit vollständig belichtet ist. Analoges gilt für die Entwicklungsdauer in Entwicklerbad: Während schwache Banden bei längerer Entwicklung an Intensität gewinnen sind starke Banden bereits nach kürzerer Zeit vollständig angefärbt. Die Entwicklungsdauer in Entwicklerbad ließ sich jedoch nicht standardisieren, da unterschiedlich lange entwickelt werden mußte, um Banden sichtbar zu machen.

Die Ungenauigkeit der Methode ist auch an den z.T. recht großen Abweichungen vom Mittelwert zu erkennen. Insgesamt sollten die erhaltenen Daten daher als semiquantitative Ergebnisse eingestuft werden, die aber durchaus in der Lage sind, klare Tendenzen, wie beispielsweise die Folgen der Mutation F195C zu zeigen.

Ein weiteres Ergebnis war die Tatsache, daß die Alkylierung der HCII-Varianten anscheinend zu unspezifischer Schädigung des HCII-Moleküls geführt hat (siehe hierzu auch F.7.2), was sich darin äußerte, daß, mit Ausnahme von HCII F195C und HCII Δ C F195C/P52C, alle alkylierten HCII-Varianten, inclusive der Cystein-freien Mutante HCII Δ C langsamer

¹ Meagher *et al.* 2000

² Ragg 1986, Westrup & Ragg 1994, Zhang *et al.* 1994, Sheffield *et al.* 1994, Colwell & Toleffsen 1998

³ Liaw *et al.* 1999

reagierten als die unbehandelten Formen. Sofern die Ausnahme bei HCII F195C nicht auf die Ungenauigkeit der Methode zurückzuführen ist, könnte es daran liegen, daß HCII F195C einzeln reduziert, alkyliert und über Mikrokonzentratoren umgepuffert wurde, während dies für alle anderen Varianten parallel erfolgte. Für HCII F195C dürfte dies dazu geführt haben, daß die Umpufferung deutlich schneller durchgeführt wurde, was zu einem kürzeren Kontakt mit Iodacetamid führte.

Eine mögliche Beeinflussung der Komplexbildungsreaktion durch Reste von Iodacetamid erscheint unwahrscheinlich, da die Proben nach der Alkylierung zwei mal mit Hilfe von Mikrokonzentratoren auf ca. $1/30$ -Volumen eingengt wurden und anschließend mit frischem Iodacetamid-freiem Puffer auf ihr Ausgangsvolumen aufgefüllt wurden. Iodacetamid, welches für die Alkylierungsreaktion 15 mM in die Reaktion eingesetzt wurde, wurde hierdurch auf ca. $1/900$ seiner Ausgangskonzentration verdünnt (siehe hierzu D.2.5.5).

Für nachfolgende Experimente sollte die Alkylierungsprozedur jedoch nochmals optimiert werden, beispielsweise durch kürzere Inkubationszeiten und/oder geringere Iodacetamidkonzentrationen.

Die Proben, welche für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung verwendet wurden, waren nach der Alkylierung, ungleich den hier verwendeten Proben, über Heparin-Sepharose partiell gereinigt worden (siehe hierzu F.7.5).

F.7.5 Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung

Um quantitative Aussagen über die reaktionsbeschleunigende Wirkung von Heparin und Dermatansulfat auf die Reaktion zwischen Wildtyp-HCII bzw. HCIIΔC F195C/P52C und Thrombin zu erhalten, wurden die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung bestimmt (siehe E.15). Für Wildtyp-HCII wurden sowohl in der Abwesenheit, als auch in der Anwesenheit von Heparin oder Dermatansulfat Geschwindigkeitskonstanten erhalten, die mit Daten aus Literaturveröffentlichungen übereinstimmen¹. In diesen Experimenten konnte kein negativer Effekt durch Reduktion und Alkylierung beobachtet werden. Sofern dies nicht im Rahmen der Meßgenauigkeit der Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten liegt (siehe dazu später), könnte es eine Folge der unterschiedlichen Reinigungsstrategien sein. Die Proben, die für die semiquantitativen Western-Blot-Experimente verwendet wurden (siehe E.13), wurden nach der Alkylierung über Mikrokonzentratoren konzentriert, umgepuffert und dabei partiell gereinigt. Die Proben, welche für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung verwendet wurden, wurden nach der Alkylierung mittels FPLC über Heparin-Sepharose partiell gereinigt. Bei der Alkylierung von Cysteinresten mit Iodacetamid können als Nebenreaktionen andere Aminosäurereste wie Methionin, Histidin und Lysin unspezifisch alkyliert werden², was zu Proteinschädigung führen kann. In der GAG-Bindestelle von HCII sind zwei Lysinreste vorhanden (siehe B.5.2). Es erscheint möglich, daß eine unspezifische Alkylierung dieser Reste die Affinität gegenüber Heparin-Sepharose beeinflußt hat, so daß dieses partiell geschädigte Material mit den modifizierten Lysinresten bei der affinitätschromatographischen Reinigung weniger stark an die Säulenmatrix gebunden hat und bei der Reinigungsprozedur abgetrennt wurde.

HCIIΔC F195C/P52C zeigte, wie bereits unter E.10 und E.13 gezeigt, bei geschlossener Disulfidbrücke sowohl in der Gegenwart, als auch in der Abwesenheit von GAGs keine meßbare Aktivität gegenüber Thrombin. Nach Reduktion und Alkylierung reagierte die HCII-Variante in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat mit Thrombin. Die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion war dabei im Vergleich zu Wildtyp-HCII, wie unter E.13 gezeigt, vermutlich aufgrund der Mutation F195C deutlich verlangsamt. Bei der Heparin-katalysierten

¹ Tollefsen *et al.* 1982, Tollefsen *et al.* 1983, Pratt *et al.* 1989, Han *et al.* 1997, Liaw *et al.* 1999

² Lundell & Scheitmüller 1999

Reaktion wurde allerdings ebenfalls eine um den Faktor 3,8 verlangsamte Reaktion im Vergleich zu Wildtyp-HCII beobachtet. Der Grund hierfür konnte nicht festgestellt werden. Es wäre jedoch nicht sehr überraschend, wenn der Austausch von fünf Aminosäuren zu einer Beeinflussung der HCII-Aktivität führen würde. Denkbar wäre auch ein, bei den vorher beschriebenen Versuchen nicht erkennbarer Einfluß der Mutation F195C.

Die Bestimmung der Aktivität von HCII Δ C F195C/P52C in der Abwesenheit von GAGs stellte ein großes Problem dar. Abschnitt E.14 hatte bereits gezeigt, daß das reduzierte und alkylierte HCII Δ C F195C/P52C-Material in der Abwesenheit von GAGs deutlich langsamer mit Thrombin reagierte als die reduzierte und alkylierte Form von Wildtyp-HCII. Sofern die oxidierte Form von HCII Δ C F195C/P52C überhaupt in der Lage ist mit Thrombin zu reagieren (siehe hierzu F.7.2), geschah dies mit nochmals deutlich geringerer Effizienz als bei der reduzierten und alkylierten Form.

In der Abwesenheit von BSA als Schutzprotein für Thrombin konnte für HCII Δ C F195C/P52C keine Aktivität ohne GAGs gemessen werden, da das Thrombin über die lange Inkubationsdauer zu instabil war. (Ein Vorversuch hatte gezeigt, daß die Thrombinaktivität bei langer Inkubationszeit in proteinfreier Lösung deutlich abnimmt (nicht dargestellt).) Bei Verwendung von BSA als Schutzprotein konnte für die reduzierte und alkylierte Form eine Thrombinhemmung gemessen werden, die ca. $\frac{1}{7}$ der Aktivität von Wildtyp-HCII ohne BSA-Zugabe betrug. BSA hatte allerdings eine reaktionsbeschleunigende Wirkung auf die Reaktion von Wildtyp-HCII und Thrombin in Abwesenheit von GAGs. Der Grund hierfür konnte nicht ermittelt werden. In Literaturveröffentlichungen wurde teilweise mit BSA-Zugabe gearbeitet ohne daß dieser Effekt beschrieben wurde¹. Denkbare Gründe könnten mangelnde Reinheit des verwendeten BSA oder die nur partielle Reinigung von HCII sein. Die grundsätzliche Fähigkeit der reduzierten und alkylierten Form von HCII Δ C F195C/P52C zur Reaktion mit Thrombin in der Abwesenheit von GAGs war jedoch bereits unter E.14 gezeigt worden. Für die oxidierte Form von HCII Δ C F195C/P52C konnte auch bei BSA-Zugabe keine Hemmung von Thrombin in Abwesenheit von GAGs festgestellt werden. Bei Betrachtung von Abbildung 62 läßt sich abschätzen, daß die oxidierte Form von HCII Δ C F195C/P52C, sofern die detektierten HCII-Thrombinkomplexe überhaupt der oxidierten Form von HCII Δ C F195C/P52C zugeordnet werden können (siehe hierzu F.7.2), nur ca. $\frac{1}{10}$ der Aktivität zeigte wie die reduzierte und alkylierte Form. Geht man von dieser Aktivität auch bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung aus, so war die verbleibende Restaktivität so gering, daß sie mit dem hier durchgeführten Test nicht mehr zu messen war, sondern im "Hintergrundrauschen" unterging.

Es muß angemerkt werden, daß die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet sein dürften. Zum einen wurde die HCII-Konzentration über ELISA bestimmt, welcher weniger genau ist als die photometrische Konzentrationsbestimmung von hochreinem Material über den molaren Extinktionskoeffizienten. Zum anderen ist das Material nur partiell aufgereinigt worden, so daß Einflüsse von anderen Komponenten auf die Reaktionsgeschwindigkeit nicht ausgeschlossen werden können. Sowohl die ausschließliche Verwendung von Heparin-Sepharose zur partiellen HCII-Reinigung, als auch die Konzentrationsbestimmung über ELISA sind für die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten in der Literatur jedoch bereits beschrieben worden². Eine weitere Quelle für Ungenauigkeiten waren die z.T. sehr kurzen Reaktionszeiten von nur fünf Sekunden, die sehr schnelles Pipettieren erforderten. Die Schwankungen zwischen verschiedenen Einzelmessungen einer Meßreihe lassen sich an den errechneten Standardabweichungen abschätzen. Bei den meisten Meßreihen betrug die Standardabweichung weniger als 15 % der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten. Bei zwei

¹ Ciaccia *et al.* 1997 a

² Derechin *et al.* 1990, Ciaccia *et al.* 1997 a

Meßreihen traten jedoch Werte von 30% und mehr auf. Zum Ausgleich dieser Ungenauigkeiten wurden bei den meisten Meßreihen mindestens acht Einzelmessungen durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung aus den Mittelwerten errechnet.

F.8 Resumé

Die vorliegende Arbeit stützt die Aussage, daß der saure N-Terminus von HCII eine kritische Rolle bei der Beschleunigung der Reaktion zwischen HCII und Thrombin durch Heparin bzw. Dermatan sulfat hat. Die kovalente Fixierung des N-Terminus am Kern des Moleküls über eine Disulfidbrücke verhinderte die Beschleunigung der Reaktion durch die beiden GAGs. Die Reduktionen der Disulfidbrücke stellt diese Fähigkeit wieder her. Die Tatsache daß die reduzierte Disulfidbrücke in HCII Δ C F195C/P52C reoxidierbar ist deutet darauf hin, daß die oxidierte Form von HCII Δ C F195C/P52C mit geschlossener Disulfidbrücke zumindest eine ähnliche Konformation aufweist, wie die reduzierte, biologisch aktive Form. Zudem unterstützt sie das Modell, nach dem der saure N-Terminus in Abwesenheit von GAGs mit der basischen GAG-Bindestelle interagiert. Ein weitgehende Inaktivierung von HCII durch die neu eingeführte Disulfidbrücke konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden aufgrund der (sofern überhaupt vorhanden) nur minimalen Reaktion mit Thrombin bei geschlossener Disulfidbrücke. Die vorliegenden Daten unterstützen die Modellvorstellung, nach der eine Positionsänderung des N-Terminus gegenüber dem Kern des Moleküls ein essentieller Bestandteil der Aktivierung von HCII durch GAGs ist.

Die erhaltenen Ergebnisse, sowohl die stark negative Wirkung der kovalenten Fixierung des N-Terminus auf die HCII-Aktivität in Abwesenheit von GAGs, als auch die Folgen der Mutation F195C deuten darauf hin, daß die Funktion der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und S2A bislang nicht ausreichend untersucht wurde. Möglicherweise ist sie für die Aktivität von HCII und/oder die Aktivierung durch GAGs, ähnlich wie bei AT, durch eine Wirkung auf das reaktive Zentrum von wesentlicher Bedeutung.

F.9 Ausblick

Die innerhalb dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben Anstoß zu einigen neuen Fragen. Ein wesentlicher Punkt ist die Frage, welche Folgen die neu eingeführte Disulfidbrücke auf die Aktivität von HCII Δ C F195C/P52C hat. Die Möglichkeit die reduzierte Disulfidbrücke *in vitro* zu reoxidieren deutet zwar darauf hin, daß N-Terminus und GAG-Bindestelle auch *in vivo* in ähnlicher räumlicher Konformation zueinander stehen, die geschlossene Disulfidbrücke hatte jedoch einen stark negativen Einfluß auf die Reaktion zwischen HCII und Thrombin auch in Abwesenheit von GAGs. Mit den durchgeführten Versuchen konnte nicht zweifelfrei gezeigt werden, ob HCII Δ C F195C/P52C im oxidierten Zustand noch in der Lage ist, mit Thrombin zu reagieren. Für die Klärung dieser Frage empfiehlt es sich, die Reaktion zwischen HCII Δ C F195C/P52C und Chymotrypsin, welche nicht durch GAGs katalysiert wird, und bei der der N-Terminus wahrscheinlich nicht mit der Protease interagiert, näher zu untersuchen. Sofern die Ausbildung der Disulfidbrücke einen Einfluß auf das reaktive Zentrum von HCII hat, sollte sich dies bei der Reaktion mit Chymotrypsin manifestieren. Eine interessante Frage wäre auch, wie die Ausbildung einer Disulfidbrücke, die sich deutlich entfernt von reaktiven Zentrum befindet, sich auf dieses auswirken kann. Da die verbleibende HCII-Restaktivität, sofern vorhanden, in der Abwesenheit von GAGs allerdings sehr gering ist, wird es wichtig sein, mögliche Störfaktoren zu minimieren. Hierzu sollten die untersuchten HCII-Varianten bis zur Homogenität aufgereinigt werden, was für HCII Δ C F195C/P52C wahrscheinlich mit einer Überarbeitung der bisherigen Aufreinigungs-

strategie verbunden sein wird. Zudem wird es wichtig sein, den vorhandenen geringen reduzierten Anteil innerhalb der Proben mit neu eingeführter Disulfidbrücke durch Reoxidation zu eliminieren und dies quantitativ zu dokumentieren.

Ein unerwartetes Ergebnis war die Wirkung der Mutation F195C. Bisherige Arbeiten hatten sich nur auf die Untersuchung der GAG-Bindestelle, vorwiegend durch Mutation der basischen Aminosäuren konzentriert. Die Mutation F195C hat gezeigt, daß für die Aktivierung von HCII durch GAGs mehr als nur die bislang charakterisierte Interaktion von sauren und basischen Ladungen von Bedeutung ist, sondern auch Elemente in der Verbindungsschleife zwischen α -Helix D und S2A beinhaltet. Es wird interessant sein herauszufinden, ob Phe195 "nur" an der Aktivierung durch Dermatansulfat beteiligt ist, oder ob die Verbindungsschleife zu S2A, ähnlich wie beim AT, Einfluß auf die Konformation des reaktiven Zentrums von HCII hat. Die Bedeutung, die diese Region im AT-Molekül hat, und die Tatsache daß eine Mutation in dieser, bei verschiedenen Spezies streng konservierten Region sich auch beim HCII negativ auf die Reaktionsbeschleunigung durch Dermatansulfat auswirkt, lassen die zweite Möglichkeit plausibel erscheinen. Denkbar wäre, daß sich die Bindung von GAGs und die Positionsänderung des N-Terminus auch auf das reaktive Zentrum von HCII auswirkt. Ein Ansatz zur Klärung dieser Frage wären Punktmutationen oder Deletionen in diesem Bereich.

Viele bisherige Veröffentlichungen über die Funktionsweise von HCII haben sich auf die Untersuchung geladener Reste beschränkt. Die Erkenntnis, daß eine unpolare, aromatische Aminosäure für die Interaktion mit einem Polyanion wichtig ist, zeigt, daß die Bedeutung des Umfeldes oder anderer Reste nicht unterschätzt werden sollte. Weitere Kandidaten für Untersuchungen, welche in diese Richtung gehen, sind Phe67 und Lys65. Von Phe67 wurde gezeigt, daß sich seine Mutation zu Val stark negativ, sowohl auf die Heparin-, als auch auf die Dermatansulfat-katalysierte Reaktion auswirkt¹. Interessant ist ebenfalls die Frage, warum bei allen bislang untersuchten Spezies Lys65 als basische Aminosäure zwischen der Akkumulation von negativ geladenen Aminosäuren in den beiden sauren Blöcke des N-Terminus konserviert ist.

Die Ausbildung von drei alternativen Disulfidbrücken war ein weiteres unerwartetes Ergebnis. Es dürfte interessant sein zu testen, ob sich auch HCII Δ C F195C/G54C und HCII Δ C F195C/S68C *in vitro* reoxidieren lassen. Sollte dies der Fall sein, würde es dafür sprechen, daß auch diese HCII-Varianten bei der kotranslationalen Faltung in ER nicht in eine unnatürliche Konformation gezwängt wurden. In diesem Fall müßte darüber nachgedacht werden, ob das bestehende Modell der Interaktion von N-Terminus und GAG-Bindestelle in Abwesenheit von GAGs nicht zu starr ist, oder ob N-Terminus und GAG-Bindestelle über alternative Salzbrücken variabel miteinander interagieren können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen eine HCII-Variante zu schaffen, die über einer "Anschaltmechanismus" verfügt. Die weitgehend inaktive oxidierte Form von HCII Δ C F195C/P52C kann durch die Reduktion der Disulfidbrücke aktiviert werden. Dies kann einen Ansatz zur weiteren Untersuchung der HCII-Funktion bieten.

¹ Ragg 1990 a

G Literaturverzeichnis

3D Crunch project (1998)

http://www.expasy.ch/swissmod/SM_3DCrunch.html

Science **280**: 1353

Abildgaard, U.; Larsen, M.L. (1984)

Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in human plasma.

Thromb. Res. **35**: 257-266

Agnelli, G., Cosmi, B.; Di Filippo, P.; Ranucci, V.; Veschi, F.; Longetti, M.; Renga, C.; Barzi, F., Gianese, F.; Lupatellei, L.; Rinoanpoli, E.; Nenci, G.G. (1992)

A randomised, double-blind, placebo-controlled trail of dermatans sulfate for prevention of deep vein thrombosis in hip fracture.

Thromb. Haemost. **67**: 203-208

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E.W.; Lipman, D.J. (1990)

Basic local alignment search tool.

J. Biol. Chem. **215**: 403-410

Amersham-Pharmacia Manual

ECL™ western blotting detection reagents 1998

Andersson, T.; Lorentzen, B.; Hogdahl, H.; Clausen, T.; Mowinckel, M.C.; Abildgaard, U. (1996)

Thrombin-inhibitor complexes in the blood during and after delivery.

Thromb. Res. **82**: 109-117

Andersson, T.R.; Sie, P.; Pelzer, H.; Aamodt, L-M.; Nustad, K.; Abildgaard, U. (1992)

Elevated levels of thrombin-heparin cofactor II complex in plasma from patients with disseminated intravascular coagulation.

Thromb. Res. **66**: 591-598

Andreason, G.L.; Evans, G.A. (1988)

Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation.

Biotechniques **6**: 650-660

Andreason, G.L.; Evans, G.A. (1989)

Optimization of electroporation for transfection of mammalian cells.

Anal. Biochem. **180**: 269-275

Andrew, M.; Mitchell, L.; Berry, L.; Paes, B.; Delorme, M.; Ofosu, F.; Burrow, R.; Khambalia, B. (1992)

An anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan circulates in the pregnant woman and her fetus.

J. Clin. Invest. **89**: 321-326

Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty, M. (1944)

Studies on the chemical nature of substances inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxiribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III.

J. Exp. Med. **79**: 137-158

Barnes, W.M. (1992)

The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by N-terminal deletion.

Gene **112**: 29-35

Bao, J-J.; Sifers, R.N.; Kidd, V.J.; Ledley, F.D.; Woo, S.L.C. (1987)

Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human α_1 -chymotrypsin and α^1 -antitrypsin genes.

Biochemistry **26**: 7755-7759

Barnes, W. M (1994)

PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**: 2216-2220

- Baum, C.; Forster, P.; Hegewisch-Becker, S.; Harber, K. (1994)
An optimized electroporation protocol applicable for a wide range of cell lines.
BioTechniques **17**: 1058-1062
- Bauman, S.J.; Church, F.C. (1999)
Enhancement of heparin cofactor II anticoagulant activity.
J. Biol. Chem. **274**: 34556-34565
- Baumann, U.; Huber, R.; Bode, W.; Grosse, D.; Lesjak, M.; Laurell, C.B. (1991)
Crystal structure of cleaved human alpha 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins.
J. Mol. Biol. **218**: 595-606
- Becker, D.L.; Fredenburgh, J.C.; Stafford, A.R. Weitz, J.I. (1999)
Exosites 1 and 2 are essential for protection of fibrin-bound thrombin from heparin-catalyzed inhibition by antithrombin and heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **274**: 6226-6233
- Bellart, J.; Gilibert, R.; Cabero, L.; Fontcuberta, J.; Monasterio, J.; Miralles, R.M. (1998)
Heparin cofactor II: a new marker for preeclampsia.
Blood Coagul Fibrinolysis **9**: 205-208
- Bendayan, P.; Boccalon, H; Dupouy, D.; Boneu, B. (1994)
Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins.
Thromb. Haemost. **71**: 576-580
- Berliner, L.J.
Thrombin. Structure and function.
Plenum Press, New York, London 1992
- Bernardi, F.; Legnani, C.; Micheletti, F.; Lunghi, B.; Ferraresi, P.; Palareti, G.; Biagi, R.; Marchetti, G. (1996)
A heparin cofactor II mutation (HCII Rimini) combined with factor V Leiden or type I protein C deficiency in two unrelated thrombophilic subjects.
Thromb. Haemost. **76**: 505-509
- Bernstein, F.C.; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.; Meyer, E.E. Jr.; Brice, M.D.; Rodgers, J.R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi M. (1977)
The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures.
J. Mol. Biol. **112** : 535-542
- Bertina, R.M.; van der Linden; I.K.; Engesser, L.; Muller, H.P.; Brommer, E.J. (1987)
Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis.
Thromb. Haemost. **57**: 196-200
- Betz, S.F. (1993)
Disulfide bonds and the stability of globular proteins.
Prot. Sci. **2**: 1551-1558
- Biorad Manual
Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit Instruction Manual
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523
- Blasey, H.D.; Aubry, J-P.; Mazzei, G.J.; Bernhard, A.R. (1996)
Large scale transient expression with COS cells.
Cytotechnology **18**: 183-192

- Blinder, M. A.; Tollefsen, D. M. (1990)
Site-directed mutagenesis of arginine 103 and lysine 185 in the proposed glycosaminoglycan-binding site of heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **265**: 286-291
- Blinder, M.A.; Marasa, J.C.; Reynolds, C.H.; Deavan, L.L.; Tollefsen, D.M. (1988)
Heparin cofactor II: cDNA sequence, chromosome location, restriction fragment polymorphism and expression in *Escherichia Coli*.
Biochemistry **27**: 752- 759
- Blinder, M.A.; Andersson, T.R.; Abilgaard, U.; Tollefsen, D.M. (1989)
Heparin Cofactor II ^{Oslo}
J. Biol. Chem. **264**: 5128-5133
- Boehringer Mannheim Manual
Dig Nucleic Acid Detection Kit Manual
- Boggs, S.S.; Gregg, R.G.; Borenstein, N.; Smithies, O. (1986)
Efficient transformation and frequent single site, single copy insertion of DNA can be obtained in mouse erythroleukemia cells transformed by electroporation.
Exper. Haematol. **14**: 988-994
- Böhme, C. (2001)
Untersuchungen zur Wechselwirkung von Heparinkofaktor II aus Plasma und rekombinanten Zellen.
Dissertation an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
- Bombeli T.; Mueller M.; Haeberli A. (1997)
Anticoagulant properties of the vascular endothelium.
Thromb. Haemost. **77**: 408-423
- Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Hasler, K.; Fleckenstein, B.; Schaffner, W. (1985)
A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus.
Cell **41**: 521-530
- Breslauer, K.J.; Frank, R.; Blocker, H.; Markey, L.A. (1986)
Pretending DNA duplex stability from the base sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**: 3746-3750
- Briginshaw, G.F.; Shanberge, J.N. (1974)
Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma.
Arch. Biochem. Biophys. **161**: 683-690
- Brister, S.J.; Ofosu, F.A.; Heigenhauer, G.J.; Gianese, F.; Buchanan, M.R. (1994)
Is heparin the ideal anticoagulant for cardiopulmonary bypass ? Dermatan sulfate may be an alternate choice.
Thromb. Haemost. **71**: 468-473
- Bruch, M.; Weiss, V.; Engel, J. (1988)
Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites.
J. Biol. Chem. **263**: 16626-16630
- Capecchi, M.R. (1980)
High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.
Cell **22**: 479-488
- Carrell, R. W.; Owen, M. (1985)
Plakalbumin, α_1 -antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis.
Nature **317**: 730-732

- Carrell, R. W.; Travis, J. (1985)
 α_1 -Antitrypsin and the serpins. Variation and countervariation.
Trends. Biol. Sci. **10**: 20-24
- Carrell, R.W.; Stein, P.E.; Fermi, G.; Wardell, M.R. (1994)
Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin.
Structure **2**: 257-270
- Cataldo, L.M.; Wang, Z.; Ravid, K.
Electroporation of DNA into cultured cells.
in : Ravid, K.; Freshney, R.I.
DNA transfer to cultured cells
Verlag Wiley-Liss, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998
- Chaney, W.G.; Howard, D.R.; Pollard, J.W.; Sallustio, S.; Stanley, P. (1986)
High frequency transfection of CHO cells using polybrene.
Somatic Cell Mol. Genet. **12**: 237-244
- Chang, J.Y. (1983)
The functional domain of hirudin, a thrombin specific-inhibitor.
FEBS Letters **164**: 307-313
- Chitolie, A.; Mackie, I.J.; Machin, S.J.; Porter, J.B. (1996)
Heparin cofactor II is depleted from plasma after incubation with normal, sickle, and thalassaemia red cells.
Br. J. Haematol. **93**: 88
- Chu, G.; Hayakawa, H.; Berg, P. (1987)
Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA.
Nucl. Acids Res. **15**: 1311-1326
- Church, F. C.; Meade, J. B.; Pratt, C. W. (1987)
Structure-function relationships in heparin cofactor II: spectral analysis of aromatic residues and absence of a role for sulfhydryl groups in thrombin inhibition.
Arch. Biochem. Biophys. **259**: 331-340
- Church, F.C.; Noyes, C.M.; Griffith, M.J. (1985)
Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 6431-6434
- Church, F.C.; Pratt, C.W.; Hoffman, M. (1991)
Leukocyte chemoattractant peptides from the serpin heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **266**: 704-709
- Ciaccia, A. V.; Willemze, A. J.; Church, F. C. (1997 a)
Heparin promotes proteolytic inactivation by thrombin of a reactive site mutant (L444R) of recombinant heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **272**: 888-893
- Ciaccia, A.V.; Monroe, D. M.; Church, F. C. (1997 b)
Arginine 200 of heparin cofactor II promotes intramolecular interactions of the acidic domain. Implication for thrombin inhibition.
J. Biol. Chem. **272**: 14074-14079
- Cline, J.; Braman, J.; Hogrefe, H.H. (1996)
PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.
Nucleic Acids. Res. **24**: 3546-3551
- Cockwell, P.; Adams, D.H.; Savage, C.O.S. (1996)
Glycosaminoglycans contribute to multiple functions of vascular endothelial cells.
Clin. Exp. Immunol. **104**:1-3

- Colwell, N.S.; Grupe, M.J.; Tollefsen, D.M. (1999)
Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibition by sulfated polyanions.
Biochim. Biophys. Acta **1431**: 148-156
- Colwell, N.S.; Tollefsen, D.M. (1998)
Isolation of frog and chicken cDNAs encoding heparin cofactor II.
Thromb. Haemost. **80**: 784-790
- Dahlbäck, B. (2000)
Blood coagulation.
Lancet **355**: 1627-1632
- Dallas-Yang, Q.; Jiang, G.; Sladek, F.M. (1998)
Avoiding false positives in colony PCR.
Biotechniques **24**: 580-582
- Daniels P.J.L. *et al.* (1973)
Thirteenth interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Abs 137 / 1973
- Danielsson, A.; Raub, E.; Lindahl U.; Bjork, I. (1986)
Role of ternary complexes, in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reaction between antithrombin and thrombin or factor Xa.
J. Biol. Chem. **261**: 15467-15473
- Darby, N.; Creighton, T.E. (1997)
Probing protein folding and stability using disulfide bonds.
Mol. Biotech. **7**: 57-77
- de Agostini, A.I.; Watkins, S.C.; Slayter, H.S.; Youssoufian, H.; Rosenberg, R.D. (1990)
Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta.
J. Cell Biol. **11**: 1293-1304
- Delorme, M.A.; Xu, L.; Berry, L.; Mitchell, L., Andrew, M. (1998)
Anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan (decorin) in the human placenta.
Thromb. Res. **90**: 147-153
- Derechin, V. M.; Blinder, M. A.; Tollefsen, D. M. (1990)
Substitution of arginine for Leu444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition.
J. Biol. Chem. **265**: 5623-5628
- Devraj-Kizuk, R.; Chui, D.H.; Prochownik, E.V.; Carter, C.J.; Oforu, F.A.; Blajchman, M.A. (1988)
Antithrombin III-Hamilton: a gene with a point mutation (guanine to adenine) in codon 382 causing impaired serine protease activity.
Blood **72**: 1518-1523
- Di Carlo, V.; Agnelli, G.; Prandoni, P.; Coccheri, S; Gensini, G.F.; Gianese, F.; Mannucci, P.M. (1999)
Dermatan sulphate for the prevention of postoperative venous thromboembolism in patients with cancer.
Thromb. Haemost. **82**: 30-34
- Doolittle, R.F. (1983)
Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family.
Science **222**: 417-419

- Egelund, R.; Rodenburg, K.W.; Andreasen, P. A.; Rasmussen, M.S.; Guldenberg, R.E.; Petersen, T.E. (1998)
An ester bond linking a fragment of a serine proteinase to its inhibitor.
Biochemistry **37**: 6375-6379
- Eldering, E.; Verpy, E.; Roem, D.; Meo, T.; Toshi, M. (1995)
COOH-terminal substitutions in the serpin C₁-inhibitor that cause loop-overinsertion and subsequent multimerisation.
J. Biol. Chem. **270**: 2579-2587
- Ellgaard, L.; Helenius, A. (2001)
ER quality control: towards an understanding at the molecular level.
Curr. Opin. Cell Biol. **13**: 431-437
- Elliott, P.R.; Abrahams, J.P.; Lomas, D.A. (1998)
Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation.
J. Mol. Biol. **275**: 419-425
- Engh, R.; Lobermann, H.; Schneider, M.; Wiegand, G.; Huber, R.; Laurell, C.B. (1989)
The S variant of human alpha-1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism.
Protein Eng. **2**: 407-415
- Engler, M.J.; Richardson, C.C.
in : *The Enzymes Vol XV*; Boyer, P.D. (ed.)
Academic Press, New York 1982
- Engvall, E.; Perlman, P. (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochem. **8**: 871-874
- Eriksson, S.; Janciauskiene, S.; Lannfelt, L. (1995)
 α_1 -antichymotrypsin regulates Alzheimer β -amyloid peptid fibril formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 2313-2317
- Ersdal-Badju, E.; Lu, A.; Zuo, Y.; Picard, V.; Bock, S.C. (1997)
Identification of the antithrombin III heparin binding site.
J. Biol. Chem. **272**: 19393-19400
- Esmon, C. T. (1993)
Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury.
Ann. Rev. Cell. Biol. **9**: 1-26
- Esmon, C. T. (2000)
Regulation of blood coagulation.
Biochim. Biophys. Acta **1477**: 349-360
- Farooqui, A.A. (1980)
Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography.
J. Chromatography **184**: 335-345
- Fanning, E.; Knippers, R. (1992)
Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen.
Annu. Rev. Biochem. **61**: 55-85
- Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M. (1987)
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**: 7413-7417
- Feliciello, I.; Chinali, G. (1993)
A modified alkaline method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *E. coli* .
Anal. Biochem. **212**: 394-401

- Foecking, M.K.; Hofstetter, H. (1986)
Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors.
Gene **45**: 101-105
- Friend, D.S.; Papahadjopoulos, D.; Debd R.J. (1996)
Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes.
Biochim. Biophys. Acta **1278**: 41-50
- Furie B.; Furie B. C. (1992)
Molecular and cellular biology of blood coagulation.
New Engl. J. Med. **326**: 800-806
- GATC Manual
DNA Sequencer 1500
- GATC Manual
Biocycle Sequencing Kit
- Ge, G.N.; Daniell, H.; Sanford, J.C. (1990)
Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts.
Plant Mol. Biol. **15**: 809-819
- Gedikli, H. (2001)
Expressionsklonierung und Experimente zur Charakterisierung des Thrombininhibitors Heparinkofactor II vom Huhn.
Diplomarbeit an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
- Geier, G.E.; Modrich, P. (1979)
Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of *Dpn I* endonuclease.
J. Biol. Chem. **254**: 1408-1413
- Gelfand, D.H.; White, T. J.
Thermostable DNA polymerases. in : Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninski, J. J., White, T, J.
PCR Protocols S. 129-141
Academic Press, New York, 1990.
- Genomed Manual
Jetsorb DNA Gel Extraction Kit 1994
- Gettins, P.W.G.; Patston, P.A.; Olson, S.T.
The Serpins
Springer Verlag , Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, 1996
- Gluzman, Y. (1981)
SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell **23**: 175-182
- Goldsack, N.R.; Chambers, R.C.; Dabbagh, K.; Laurent, G.J. (1998)
Thrombin
Int. J. Biochem. Cell Biol. **30**: 641-646
- Gooptu, B.; Hazes, B.; Chang, T.; Dafforn, D. R.; Carrell, R. W.; Read, R. J. Lomas, D. A. (2000)
Inactive conformation of the serpin $\alpha 1$ -antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: Implications for inhibitory function and conformational disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**:67-72

- Graham, F.L.; van der Eb, A.J. (1973)
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology **52**: 456-467
- Griffith, M.J.; Carraway, T.; White, G.C.; Dombrose, F.A. (1983)
Heparin cofactor activities in a family with hereditary antithrombin III deficiency: Evidence for a second heparin cofactor in human plasma.
Blood **61**:111-118
- Griffith, M.J.; Noyes, C.M.; Church, F.C. (1985 a)
Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III.
J. Biol. Chem. **260**: 2218-2225
- Griffith, M.J.; Noyes, C.M.; Tyndall, J.A.; Church, F.C. (1985 b)
Structural evidence for leucine at the reactive site of heparin cofactor II.
Biochemistry **24**: 677-6782
- Gross ; Witkop (1961)
Selective cleavage of the methionyl peptide bond in ribonuclease with cyanogen bromide.
J. Am. Chem. Soc. **83**: 1510-1511
- Ham, R.G.; McKeehan, W.L. (1979)
Media and growth requirements.
Methods Enzymol. **58**: 44-93
- Hammond, C.; Helenius, A. (1994)
Quality control in the secretory pathway: Retention of misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment and golgi apparatus.
J. Cell Biol. **126**: 41-52
- Hammond, G. L.; Smith, C.L.; Goping, I.S.; Underhill, D.A.; Harley, M. J.; Reventos, J.; Musto, N. A.; Gunsalus, G.L.; Bardin, C.W. (1987)
Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serin protease inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**: 5153-5157
- Han, J.H.; van Deerlin, V.M.; Tollefsen, D.M. (1997)
Heparin facilitates dissociation of complexes between thrombin and a reactive site mutant (L444R) of heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **272**: 8243-8249
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557-580
- Hatton, M.C.; Hoogendoorn, H.; Southward, S.M.R.; Ross, B.; Blajchman. A (1997)
Comparative metabolism and distribution of rabbit heparin cofactor II and antithrombin in rabbits.
Am. J. Physiol. **272**: E824-E831
- Hatton, M.W.; Ross, B.; Southward, S.M.; Dereske, M.; Hoogendoorn, H.; Blajchman, M.A.; Richardson, M. (1999)
Uptake of heparin cofactor II and antithrombin into the aorta wall after deendothelializing injury in vivo: comparison with the behaviors of prothrombin and fibrinogen.
J. Lab. Clin. Med. **133**: 81-87
- Hawley-Nelson, P.; Ciccarone, V.; Gebeyehu, G.; Jessee; Felgner, P.L. (1993)
Lipofectamin reagent: a new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent.
Focus **15**: 73-78
- Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Lee, J-B.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N. (2000 a)
Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan.
J. Biol. Chem. **275**: 11379-11382

- Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Hayashi, K.; Hayashi, T.; Ozawa, T.; Niiya, K.; Sakuragawa, N. (1996)
Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan.
Blood Coagul. Fibrinol. **7**: 554-560
- Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Lee, J.; Srisomporn, P.; Maede, M.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N. (2000 b)
Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae.
Biochim. Biophys. Acta **1543**: 86-94
- Hayashi, T.; Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Sasaki, H.; Sakuragawa, N. (1997)
Sulfated polysaccharide from the leaves of *artemisia princeps* activates heparin cofactor II independently of the Lys173 Arg189 residues of heparin cofactor II.
Thromb. Res. **87**: 105-112
- Helenius, A. (2001)
Quality control in the secretory pathway.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **356**: 147-150
- Hellweg, E. (2000)
Untersuchungen zur Expression des Heparinkofaktor II-Gens in HepG2-Zellen unter dem Einfluß externer Faktoren.
Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
- Herzog, R.; Lutz, S.; Blin, N.; Marasa, J.C.; Blinder, M.A.; Tollefsen, D.M. (1991)
Complete nucleotide sequence of the gene for human heparin cofactor II and mapping to chromosomal band 22q11.
Biochemistry **30**: 1350-1357
- Higuchi, R.; Krummel, B.; Saiki, R.K. (1988)
A general method for in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions.
Nucleic Acids Res. **16**: 7351-7367
- Hiramoto, S.A.; Cunningham, D.D. (1988)
Effects of fibroblasts and endothelial cells on inactivation of target proteases by protease nexin-1, heparin cofactor II and C1-inhibitor.
J. Cell. Biochem. **36**: 199-207
- Hirayoshi, K.; Kudo, H.; Takechi, H.; Nikai, A.; Iwamatsu, A.; Yamada, K.M.; Nagata, K. (1991)
HSP47: a tissue specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts.
Mol. Cell. Biol. **11**: 4036-4044
- Ho, S.N.; Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989)
Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene **77**: 51-59
- Hoffman, M.; Pratt, C.W.; Brown, R.L.; Church, F.C. (1989)
Heparin cofactor II-proteinase reaction products exhibit neutrophil chemoattractant activity.
Blood **73**: 1682-1685
- Hofmann, M.A.; Brain, D.A. (1991)
Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony.
Biotechniques **11**: 30-31
- Holland, C.A.; Henry, A.T.; Whinna, H.C.; Church, F.C. (2000)
Effect of oligodeoxynucleotide thrombin aptamer on thrombin inhibition by heparin cofactor II and antithrombin.
FEBS Letters **484**: 87-91
- Holmes, W.E.; Lijnen, H.R.; Nelles, L.; Kluft, C.; Nieuwenhuis, H.K.; Rijken, D.C.; Collen, D. (1987)
Alpha 2-antiplasmin Enschede: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity.
Science **238**: 209-211

- Hopkins, P. C.; Carrell, R. W.; Stone, S.R. (1993)
Effects of mutations in the hinge region of serpins.
Biochemistry **32**: 7650-7657
- Hopkins, P.C.; Chang, W.S.; Wardell, M.R.; Stone, S. R. (1997)
Inhibitory mechanism of serpins. Mobility of the C-terminal region of the reactive-site loop.
J. Biol. Chem. **272**: 3905-3909
- Hortin, G.L.; Tollefsen, D.M.; Benutto B.M. (1989)
Antithrombin activity of a peptide corresponding to residues 54-75 of heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **264**: 13979-13982
- Hortin, G.; Tollefsen, D.M.; Strauss, A.W. (1986)
Identification of two sites of sulfatation of human heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **261**: 15827-15830
- Huber, R.; Carrell, R.W. (1989)
Implications of the three-dimensional structure of α_1 -antitrypsin for structure and function of serpins.
Biochemistry **28**: 8951-8966
- Huntington, J.A.; Read, R.J.; Carrell, R.W. (2000 a)
Structure of serpin-protease complex shows inhibition by deformation.
Nature **407**: 923-926
- Huntington, J.A.; McCoy, A.; Belzar, K.J.; Pei, X.Y.; Gettins, P.G.; Carrell, R.W. (2000 b)
The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions.
J. Biol. Chem. **275**: 15377-15383
- Hurst R.E.; Poon, M.C.; Griffith, M.J. (1983)
Structure-activity relationships of heparin. Independence of heparin charge density and antithrombin-binding domains in thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II.
J. Clin. Invest. **72**: 1042-1045
- Hurtley, S.M.; Bole, D.G.; Hoover-Litty, H.; Helenius, A.; Copeland, C.S. (1989)
Interaction of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP).
J. Cell Biol. **108**: 2117-2126
- Invitrogen Manual
pcDNA3.1(+), pcDNA 3.1(-) Version F /1999
- Iozzo, R.V. (1998)
Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function.
Annu. Rev. Biochem. **67**: 609-652
- Irving, J.A.; Pike, R.N.; Lesk, A.M.; Whisstock, J.C. (2000)
Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function.
Genome Res. **10**: 1845-1864
- Ishiguro, K.; Kojima, T.; Kadomatsu, K.; Nakayama, Y.; Takagi, A.; Suzuki, M.; Takeda, N.; Ito, M.; Yamamoto, K.; Matsushita, T.; Kusugami, K.; Muramatsu, T.; Saito, H. (2000)
Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality.
J. Clin. Invest. **106**: 873-878
- Jaffe, E.A.; Armellino, D.; Tollefsen, D.M. (1985)
Biosynthesis of functionally active heparin cofactor II by a human hepatoma derived cell line.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **132**: 368-374
- Jin, L.; Abrahams, J.P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R.N.; Carrell, R.W. (1997)
The anticoagulant activation of antithrombin by heparin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 14683-14688

- Kadowaki, H.; Kadowaki, T.; Wondisford, F.E.; Taylor, S.I. (1989)
Use of polymerase chain reaction catalysed by *Taq* DNA polymerase for site-specific mutagenesis.
Gene **76**: 161-166
- Kario, K.; Matsuo, T.; Kobayashi, H. (1992)
Heparin cofactor II deficiency in the elderly: comparison with antithrombin III.
Thromb. Res. **66**: 489-498
- Kamp, P-B.; Strathmann, A.; Ragg, H. (2001)
Heparin cofactor II, antithrombin- β and their complexes with thrombin in human tissues.
Thromb. Res. **101**: 483-491
- Kasza, A.; Peterson, H.H.; Heegaard, C.W.; Oka, K.; Christensen, A.; Dubin, A.; Chan, L.; Andreasen, P.A. (1997)
Specificity of proteinase/serpin complex binding to very-low-density lipoprotein receptor and α_2 -macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein-receptor-related protein.
Eur. J. Biochem. **248**: 270-281
- Kaufman, R.J.; Sharp, P.A. (1982)
Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene.
J. Mol. Biol. **159**: 601-621
- Kellner, R.; Lottspeich, F.; Meyer, H.E.
Microcharacterization of proteins
VCH Verlag; Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1994
- Kjellén, L.; Lindahl, U. (1991)
Proteoglycans: structures and interactions.
Annu. Rev. Biochem. **60**: 443-475
- Koike, C.; Hayakawa, Y.; Niiya, K.; Sakuragawa, N.; Sasaki, H. (1996)
The production of heparin cofactor II is not regulated by inflammatory cytokines in human hepatoma cells: Comparison with plasminogen activator inhibitor type-1.
Thromb. Haemost. **75**: 298-302
- Komiyama, T.; Ray, C. A.; Pickup, D.J.; Howard, A.D.; Thornberry, N.A.; Peterson, E.P.; Salvesen, G. (1994)
Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition.
J. Biol. Chem. **269**: 19331-19337 ,
- Kounnas, M.Z.; Church, F.C.; Argraves, W. S.; Strickland, D.K. (1996)
Cellular internalisation and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and α_1 -antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein.
J. Biol. Chem. **271**: 6523-6529
- Kozulic, B. (1995)
Models for gel electrophoresis
Anal Biochem. **231**: 1-12
- Krepulat, F. (1999)
Untersuchungen zur Expression von Heparinkofaktor II und Varianten mit Immuno-Tags in *E. coli*.
Diplomarbeit an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
- Kuhn, L.A.; Griffin, J.H.; Fisher, C.L.; Greengard, J.S.; Bouma, B.N.; Espana, F.; Tainer, J.A. (1990)
Elucidating the structural chemistry of glycosaminoglycan recognition by protein C inhibitor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 8506-8510.

- Kurano, N.; Leist, C.; Messi, F.; Gandor, C.; Kurano, S. Fiechter A (1990)
Growth kinetics of chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 3. Selection of an anchorage-independent subline and medium improvements.
J. Biotechnol. **16**: 245-258
- Kvassman, J-O; Verhamme, I.; Shore, J.D. (1998)
Inhibitory mechanism of serpins: loop insertion forces acylation of plasminogen activator by plasminogen activator inhibitor-1.
Biochemistry **37**: 15491-15502
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685
- Lamoureux, G.V., Whitesides, G.M. (1993)
Synthesis of dithiols as reducing agents for disulfides in neutral aqueous solution and comparison of reduction potentials.
J.Org. Chem. **58**: 633-641
- Lawrence, D.A.; Ginsburg, D.; Day, D.E.; Berkenpas, M.B.; Verhamme, I.M.; Kvassman, J-O.; Shore, J.D. (1995)
Serpine-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates.
J. Biol. Chem. **270**: 25309-25312
- Lawrence, D.A.; Olson, S.T.; Muhammad, S.; Day, D.E.; Kvassman, J-O.; Ginsburg, D., Shore, J.D. (2000)
Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into β -sheet A.
J. Biol. Chem. **275**: 5839-5844
- Lehle, K.; Kohnert, U.; Stern, A.; Popp, F.; Jaenicke, R. (1996)
Effects of disulfide bonds on the structure, function and stability of the trypsin/tPA inhibitor from *Erythrina caffra*: site-directed mutagenesis, expression and physicochemical characterization.
Nat. Biotechnol. **14**: 476-480
- Liaw, P.C.Y.; Austin, R.C.; Fredenburgh, J.C.; Stafford, A.R.; Weitz, J.I. (1999)
Comparison of heparin- and dermatan sulfate-mediated catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **274**: 27597-27604
- Li-Cor
Li-Cor 4200 Series Sequencing Manual 1998
- Lindahl, U.; Thunberg, L.; Backstrom, G.; Riesenfeld, J., Nordling, K.; Bjork, I. (1984)
Extensions and structural variability in antithrombin-binding sequence in heparin.
J. Biol. Chem. **259**: 12368-12376
- Lindl, T.; Bauer, J.
Zell- und Gebebekultur 3. überarbeitete und erweiterte Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York 1994
- Liu, L.; Dewar, L.; Song, Y.; Kulczycky, M.; Blajchman, M.A.; Fenton, J.W. 2nd; Andrew, M.; Delorme, M.; Ginsberg, J.; Preissner, K.T.; Ofose, F.A. (1995)
Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo.
Thromb. Haemost. **73**: 405-412
- Liu, Z.G.; Schwartz, L.M. (1992)
An efficient method for blunt-end ligation of PCR-products.
Biotechniques **12**: 28, 30
- Lomas, D.A.; Evans, D.L.; Finch, J.T.; Carrell, R.W. (1992)
The mechanism of Z α_1 -antitrypsin accumulation in the liver.
Nature **357**: 605-607

- Longas, M.O.; Ferguson, W.S.; Finlay, T.H (1980)
A disulfide bond in antithrombin is required for heparin-accelerated thrombin inactivation.
J. Biol. Chem **255**: 3436-3441
- Lottspeich F.; Zorbas, H.
Bioanalytik
Spektum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1998
- Lund, A.H.; Duch, M.; Pedersen, F.S. (1996)
Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation.
Nucleic Acids. Res. **24**: 800-801
- Lundberg, K.S.; Shoemaker, D.D.; Adams, M.W.; Short, J.M.; Sorge, J.A.; Mathur, E.J. (1991)
High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*.
Gene **108**: 1-6
- Lundell, N.; Schreitmüller, T. (1999)
Sample preparation for peptide mapping - A pharmaceutical quality-control perspective.
Anal. Biochem. **266**: 31-47
- Maaroufi, R.M.; Jozefowicz, M.; Tapon-Breaudière, J.; Jozefowicz, J.; Fischer, A-M. (1997)
Mechanism of thrombin inhibition by heparin cofactor II in the presence of dermatan sulfates, native or oversulfated, and a heparin-like dextran derivate.
Biomaterials **18**: 359-366
- Mackie, I.J.; Segal, H.; Burren, T.; Gallimore, M.; Walshe, K.J.; Robinson, G.; Machin, S.J. (1990)
Heparin cofactor II levels are increased by the use of combined oral contraceptives.
Blood Coagul. Fibrinol. **1**: 647-651
- Maimone, M.M. (1990)
Characterization of heparin and dermatan sulfate molecules that bind and activate heparin cofactor II.
Ph. D. thesis. Washington University, St. Louis; USA
- Maimone, M.M.; Tollefsen, D.M. (1990)
Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity.
J. Biol. Chem. **265**: 18263-18271
- Mandel, M.; Higa, A. (1970)
Calcium dependent bacteriophage DNA infection.
J. Mol. Biol. **53**: 159-162
- Mann, K. G. (1999)
Biochemistry and physiology of blood coagulation.
Thromb. Haemost. **82**: 165-174
- Marshall, C.J. (1993)
Evolutionary relationship among the serpins.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. **342**: 101-119
- Massouh, M.; Jatoi, A.; Gordon, E.M.; Ratnoff, O.D. (1989)
Heparin cofactor II activity in plasma during pregnancy and oral contraceptiva use.
J. Lab. Clin. Med. **114**: 697-699
- Mathieu-Daudé, F.; Welsh, J.; Vogt, T.; McClelland, M. (1996)
DNA rehybridisation during PCR: the 'C₀t' effect and its consequences.
Nucleic Acids Res. **24**: 2080-2086
- Matsumura, M.; Becktel, W.J.; Levitt, M.; Matthews, B.M. (1989)
Stabilization of phage T4 lysozyme by engineering disulfide bonds.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 6562-6566

- Matsumura, M.; Matthews, B. W. (1991)
Stabilization of functional proteins by introduction of multiple disulfide bonds.
Meth. Enzymol. **202**: 336-356
- Maxam, A.M.; Gilbert, W. (1977)
A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**: 560- 564
- May, M.S.; Hattman, S. (1975)
Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes.
J. Bacteriol. **123**: 768-770
- McDonell, M.W.; Simon, M.N.; Studier, F.W. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. **110**:119-146
- McGuire, E. A.; Tollefsen, D.M. (1987)
Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cells.
J. Biol. Chem. **262**: 169-175
- Meagher, J.L.; Olson, S.T.; Gettins, P.W.G. (2000)
Critical role of the linker region between helix D and strand 2A in heparin activation of antithrombin.
J. Biol. Chem. **275**: 2698-2704
- Mellon, P.; Parker, V.; Gluzman, Y.; Maniatis, T. (1981)
Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system.
Cell **27**: 229-288
- Merkblatt M002 der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie 12/89
Cyanwasserstoff, Blausäure, Cyanide
- Mislick, K.A.; Baldeschwieler, J.D. (1996)
Evidence for the role of proteoglycans in the cation-mediated gene transfer.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 12349-12354
- Morrison, J.R.; Fidge, N.H.; Grego, B. (1990)
Studies on the formation, separation, and characterization of cyanogen bromide fragments of human AI apolipoprotein.
Anal. Biochem. **186**: 145-52.
- Mottonen, J.; Strand, A.; Symersky, J.; Sweet, R. M.; Danley, D.E.; Geoghegan, K.F.; Gerard, R. D.; Goldsmith, E. J. (1992)
Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1.
Nature **355**: 270-273
- Mourey, L.; Samama, J.-P.; Delarue, M.; Petitou, M.; Choay, J.; Moras, D. (1993)
Crystal structure of cleaved bovine antithrombin III at 3.2 Å resolution.
J. Mol. Biol. **232**: 223-241
- Mullis, K.B. (1990)
Eine Nachfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion.
Spektrum der Wissenschaft **6**: 60-67
- Mullis, K. B.; Faloona, F.A. (1987)
Specific synthesis of DNA via a polymerase-catalyzed reaction.
Methods Enzymol. **155**, 335-350
- Murray, V. (1989)
Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction.
Nucleic Acids Res. **17**: 8889

- Myles, T.; Church, F.C.; Whinna, H.C.; Monard, D.; Stone, S.R. (1998)
Role of thrombin anion-binding exosite I in the formation of thrombin-serpin complexes.
J. Biol. Chem. **273**: 31203-31208
- Nar, H.; Bauer, M.; Stassen, J.M.; Lang, D.; Gils, A.; Declerck, D.J. (2000)
Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin interactions.
J. Mol. Biol. **297**: 683-695
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P.H. (1982)
Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.
EMBO J. **1**: 841-845
- Neville, D.M. jr. (1971)
Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.
J. Biol. Chem. **246**: 6328-6334
- New England Biolabs
Catalog & Technical Reference 2000/2001
- Novex Manual
Novex Western Transfer Apparatus Instructions 1995
- Novex Manual
Precast Gel Instruction 1997
- O'Malley, K.M.; Cooperman, B.S. (2001)
Formation of the covalent chymotrypsin-antichymotrypsin complex involves no large-scale movement of the enzyme.
J. Biol. Chem. **276**: 6631-6637
- Pantoliano, M.W.; Ladner, R.C.; Bryan, P.N.; Rollence, M.L.; Wood, J.F.; Poulos, T.L. (1987)
Protein engineering of subtilin BPN': Enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond.
Biochemistry **26**: 2077-2082
- Pearson, W.R.; Lipman, D.J. (1988)
Improved tools for biological sequence comparison.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**: 2444-2448
- Peitsch, M.C. (1995 a)
Protein modelling by E-Mail.
Bio/Technology **13**: 658-660
- Peitsch, M.C.; Herzyk, P. (1996)
ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automatic comparative protein modelling.
Biochem. Soc. Trans. **24**: 274-279
- Peitsch, M.C. (1995 b)
ProMod: automated knowledge-based protein modelling tool.
PDB Quarterly Newsletter **72**: 4
- Phillips, J.E.; Shirk, R.A.; Whinna, H.C.; Henriksen, R.A.; Church, F.C. (1993)
Inhibition of dysthrombin quick I and quick II by heparin cofactor II and antithrombin.
J. Biol. Chem. **268**: 3321-3327
- Picard, V.; Ersdahl-Badju, E.; Lu, A.; Bock, S. C. (1994)
A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA polymerase.
Nucleic Acids Res. **22**: 2587-2591

Pike, R.N.; Potempa, J.; Skinner, R.; Fitton, H.L.; McGraw, W.T.; Travis, J.; Owen, M.; Jin, L.; Carrell, R.W. (1997)

Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity.

J. Biol. Chem. **272**: 19652-19655

Pollitt, S.; Zalkin, H. (1983)

Role of primary structure and disulfide bond formation in beta-lactamase secretion.

J. Bacteriol. **153**: 27-32

Porstman, B.; Porstman, T.

Chromogenic substrates for enzyme immunoassay.

in Ngo, T.T. (ed): Nonisotopic immunoassays.

Plenum Press, New York 1988

Potempa, J.; Korzus, E., Travis, J. (1994)

The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation.

J. Biol. Chem. **269**: 15957-15960

Pratt C.W.; Tobin, R.B.; Church, F.C. (1990)

Interaction of heparin cofactor II with neutrophil elastase and cathepsin G.

J. Biol. Chem. **265**: 6092-6097

Pratt, C. W.; Whinna, H. C.; Church F. C. (1992)

A comparison of three heparin-binding serine proteinase inhibitors.

J. Biol Chem . **267**: 8795-8801

Pratt, C. W.; Whinna, H.C.; Meade, J.B.; Treanor, R.E.; Church, F.C. (1989)

Physicochemical aspects of heparin cofactor II.

Ann. NY Acad. Sci. **556**: 104-114

Promega Protocols and Applications Guide, Third Edition

Promega Corporation 1996

Puck, T.T.; Cieciura, S.J.; Robinson, A. (1958)

Genetics of somatic mammalian cells; III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.

J. Exp. Med. **108**: 945-956

Qiagen

The Qiagen guide to template purification and DNA sequencing.

1994 S. 38

Qiagen Manual

QIAquick™Spin Handbook 1999

Qiagen News

Effect of template quality.

Qiagen News 1997, **1**: 8

Radler, J.O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya C.R. (1997)

Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes.

Science **275**: 810-814

Ragg H. (1986)

A new member of the plasma protease inhibitor gene family.

Nucleic Acids Res. **14**: 1073-1088

- Ragg, H.; Lokot, T.; Kamp, P-B.; Atchley, W. R., Dress A. (2001)
Vertebrate serpins: Construction of a consistent phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analysis.
Mol. Biol. Evol. **18**: 577-584
- Ragg, H.; Preibisch, G. (1988)
Structure and expression of the gene coding for the human serpin hLS2.
J. Biol. Chem. **263**: 12129-12134
- Ragg, H.; Ulshöfer, T.; Gerewitz, J. (1990 a)
On the activation of human leuserpin-2, a thrombin inhibitor, by glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. **265**: 5211-5218
- Ragg, H.; Ulshöfer, T.; Gerewitz J (1990 b)
Glycosaminoglycan-mediated leuserpin-2/thrombin interaction. Structure-function relationships.
J. Biol. Chem. **265**: 22386-22391
- Reiss, M.; Jastreboff, M.M.; Bertino, J.R.; Narayanan, R. (1986)
DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**: 244-249
- Remold-O'Donnell, E. (1993)
The ovalbumin family of serpin proteins.
FEBS Lett. **315**: 105-108
- Richardson, J.S. (1981)
The anatomy and taxonomy of protein structure.
Adv. Protein. Chem. **34**: 167-339
- Ringold, G.; Dieckman, B.; Lee, F. (1981)
Coexpression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in chinese hamster ovary cells.
J. Mol. Appl. Genet. **1**: 165-175
- Roberts H. R.; Lozier J. N. (1992)
New perspectives on the coagulation cascade.
Hospital Practice. **27**: 97-112
- Rogers, S.J.; Pratt, C.W.; Whinna, H.C.; Church, F.C. (1992)
Role of thrombin exosites in inhibition by heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **267**: 3613-3617
- Rosenberg, R. D.; Aird, W. C. (1999)
Vascular-bed-specific haemostasis and hypercoagulable states.
New Engl. J. Med. **340**: 1555-1564
- Russell, W.C.; Newman, C.; Williamson, D.M. (1975)
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.
Nature **253**: 461-462
- Rychlik, W. (1995)
Selection of primers for polymerase chain reaktion.
Mol. Biotechnol. **3**: 129-134
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F., Mullis, K. B.; Horn, G.. T.; Ehrlich; H. A.; Arnheim, N. (1985)
Enzymatic amplification of β Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230**: 1350-1354

- Sambrook, J.; Frisch, E.F.; Maniatis, T.
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Edition
Verlag Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview, New York 1989
- Sandset, P.M.; Andersson, T.R. (1989)
Coagulation inhibitors in pneumonia and stroke: changes due to consumption and acute phase reaction.
J. Intern. Med. **225**: 311-316
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**: 5463-5467
- Sarkar, G.; Sommer, S.S. (1992)
Double-stranded DNA segments can efficiently prime the amplification of genomic DNA.
Nucleic Acids Res. **20**: 4937-4938
- Schägger, H.; Aquila, H.; von Jagow, G. (1988)
Coomassie-blue sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.
Anal. Biochem. **173**: 201-205
- Schechter, I.; Berger, A. (1967)
On the size of the active site in proteases. I. Papain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**: 157-162
- Schimke, R.T. (1988)
Gene amplification in cultured cells.
J. Biol. Chem. **263**: 5989-5992
- Schlegel, G.
Allgemeine Mikrobiologie 6. bzw. 7. überarbeitete Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1985 bzw. 1992
- Schmidt U. (1997)
Untersuchungen zur Expression von Leuserpin-2-mRNA in menschlichen Geweben.
Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
- Seed, B. (1987)
An LFA-3 cDNA encodes a phospholipide-linked membrane protein homologous to its receptor CD2.
Nature **329**: 840-842
- Sheehan, J.P.; Tollefsen, D.M.; Sadler, J.E. (1994)
Heparin cofactor II is regulated allosterically and not primary by template effects.
J. Biol. Chem. **269**: 32747-32751
- Sheffield, W. P.; Schuyler, P. D.; Blajchman M. A. (1994)
Molecular cloning and expression of rabbit heparin cofactor II: a plasma thrombin inhibitor highly conserved between species.
Thromb. Haemost. **71**: 778-782
- Sheffield, W.P., Blajchman, M.A. (1995)
Deletion mutagenesis of heparin cofactor II: defining the minimum size of a thrombin inhibiting serpin.
FEBS Letters **365**: 189-192
- Shirk, R.A.; Church, F.C.; Wagner, W.D. (1996)
Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by heparin cofactor II.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **16**: 1138-1148
- Sié, P.; Dupouy, D.; Pichon, J.; Boneu, B. (1985 a)
Constitutional heparin cofactor deficiency associated with recurrent thrombosis.
Lancet **8452**: 414-416

- Sié, P.; Dupouy, D.; Pichon, J.; Boneu, B. (1985 b)
Turnover study of heparin cofactor II in healthy man.
Thromb. Haemost. **54**: 635-638
- Simcox, T.G.; Marsh, S.J.; Gross, E.A.; Lernhardt, W.; Davis, S.; Simcox, M.E. (1991)
*Srf*I a new type-II restriction endonuclease that recognizes the octanucleotide sequence GCCCGGGC.
Gene **109**: 121-123
- Simioni, P.; Lazzaro, A.R.; Coser, E.; Salmistraro, G.; Girolami, A. (1990)
Hereditary heparin cofactor II deficiency and thrombosis: report of six patients belonging to two separate kindreds.
Blood Coagul. Fibrinol. **1**: 351-356
- Skinner, R.; Abrahams, J-P.; Whisstock, J.C.; Lesk, A.M.; Carrell, R.W.; Wardel, M.R. (1997)
The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site.
J. Mol. Biol. **266**: 601-609
- Smith, H.O.; Birnstiel, M. L. (1976)
A simple method for DNA restriction mapping.
Nucleic Acids Res. **3**: 2387-2398
- Southern, E. (1979)
Gelelectrophoresis of restriction fragments.
Meth. Enzymol. **68**: 152-176
- Southern, P.J.; Berg, P. (1982)
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance by a bacterial gene under control of the SV 40 early region promoter.
J. Mol. Appl. Gen. **1**: 327-339
- Stein, P. E.; Carrell, R. W. (1995)
What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?
Nat. Struct. Biol. **2**: 96-113
- Stein, P.E.; Leslie, A.G.; Finch, J.T.; Carrell, R.W. (1991)
Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution.
J. Mol. Biol. **221**: 941-959
- Stone, S. R.; Le Bonniec, B. F. (1997)
Inhibitory mechanism of serpins: Identification of steps involving the active-site serine residue of the protease.
J. Biol. Chem. **265**: 344-362
- Stratagene Instruction Manual
PCR-Script™ SK(+) Cloning Kit 1994
- Stratagene Instruction Manual
Pfu DNA polymerase 1996
- Stratikos, E.; Gettins, P.G.W. (1998)
Mapping of a serpin protease complex using single cysteine variants of α_1 -proteinase inhibitor Pittsburgh.
J. Biol. Chem. **273**: 15582-15589
- Stratikos, E.; Gettins, P.G.W. (1999)
Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into β -sheet A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**: 4808-4813
- Stratikos, E.; Gettins, P.G.W. (1997)
Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 453-458

- Stryer, L.
Biochemie
4. Auflage
Spektum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1996
- Suggs, S.V.; Hirose, T.; Miyake, T.; Kawashima, E.H.; Johnson, M.J.; Ikatura, K.; Wallace, R.B.
Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences.
in Brown, D.D.; Fox, C.F. (ed) *Developmental Biology Using Purified Genes* pp. 683-693
Academic Press, New York, 1981
- Suzuki, M.; Giovannoni, S. (1996)
Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR.
Appl. Environ. Microbiol. **62**: 625-30
- Tan, R-Y; Mabuchi, Y.; Graberek, Z. (1996)
Blocking the Ca²⁺-induced conformational transitions in calmodulin with disulfide bonds.
J. Biol. Chem. **271**: 7479-7483
- Teien, A.N.; Abildgaard, U.; Hook, M. (1976)
The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate.
Thromb. Res. **8**: 859-867
- Thornton J.M. (1981)
Disulfide bridges in globular proteins.
J. Mol. Biol. **151**: 261-287
- Tollefsen, D.M.; Blank, M.K. (1981)
Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.
J. Clin. Invest. **68**: 589-596
- Tollefsen, D.M.; Pestka, C.A. (1985)
Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure.
Blood **66**: 769-774
- Tollefsen, D.M.; Majerus, D.W.; Blank, M.K. (1982)
Heparin Cofactor II: Purification and properties of a heparin dependent inhibitor of thrombin in human plasma.
J. Biol. Chem. **257** : 2162-2169
- Tollefsen; D.M.; Pestka, C.A.; Monafu, W.J. (1983)
Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate.
J. Biol. Chem. **258**: 6713-6716
- Toulon, P.; Gandrille, S.; Remy, P.; Chadeuf, G.; Jouvin, M.H.; Aiach, M. (1992)
Significance of high levels of heparin cofactor II in the plasma and urine of adult patients with nephrotic syndrome.
Nephron **60**: 176-180
- Toulon, P.; Lamine, M.; Ledjev, I.; Guez, T.; Holleman, M.E.; Sereni, D.; Sicard, D. (1993)
Heparin cofactor II deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus.
Thromb. Haemost. **70**: 730-735
- Toulon, P.; Moulonguet-Doleris, L.; Costa, J.M.; Aiach, M. (1991 a)
Heparin cofactor II deficiency in renal allograft recipients: no correlation with the development of thrombosis.
Thromb. Haemost. **65**: 20-24
- Toulon, P.; Vitoux, J.F.; Fiessinger, J.N.; Sicard, D.; Aiach, M. (1991 b)
Heparin cofactor II: an acute phase reactant in patients with deep vein thrombosis.
Blood Coagul. Fibrinol. **2**: 435-439

- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **76**: 4350-4354
- Tran, T.H.; Marbet, G.A.; Duckert, F. (1985)
Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis.
Lancet **8452**: 413-414
- Tyagi, S.C. (1996)
Role of oxidative mixed-disulfide formation in elastase-serine proteinase inhibitor (serpin) complex.
Biochem Cell Biol.**74**: 391-401
- Uchida, T.; Unno, M.; Ishimori, K.; Morishima, I. (1997)
Effects of the intramolecular disulfide bond on ligand binding dynamics in myoglobin.
Biochemistry **36**: 324-332
- Urlaub, G.; Chasin, L.A. (1980)
Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate-reductase activity.
Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A. **77**: 4216-4220
- Vaheri, A.; Pagano, J.S. (1965)
Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D).
Arch. Gesamte Virusforsch. **17**: 456-464
- Valette, F.; Mege, E.; Reiss, A.; Milton, A. (1989)
Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction.
Nucleic Acids Res. **17**: 723-733
- van Deerlin, V.M.D.; Tollefsen, D.M. (1991)
The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans.
J. Biol. Chem. **266**: 20223-20231
- van Hove, J.L.; Yang, H.W.; Wu, J.Y.; Brady, R.O.; Chen, Y.T. (1996)
High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha-glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 65-70
- Villa, P.; Aznar, J.; Vaya, A.; Espana, F.; Ferrando, F.; Mira, Y.; Estelles, A. (1999)
Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis.
Thromb. Haemost. **82**: 1011-1014
- Weber K; Pringle, J.R.; Osborn, M. (1971)
Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel.
Methods. Enzymol. **26**: 3-27
- Weber, K.; Osborn, M. (1969)
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. **244**: 4406-12
- Weisdorf, D.J.; Edson, J.R. (1991)
Recurrent venous thrombosis associated with inherited deficiency of heparin cofactor II.
Brit. J. Haematol. **77**: 125-126
- Weiss, B.; Live, T.R.; Richardson, C.C. (1968)
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. V. End group labeling and analysis of deoxyribonucleic acid containing single stranded breaks.
J. Biol. Chem. **243**: 4530-4542

- Wells, J. A.; Powers, D. B. (1986).
In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin.
J. Biol. Chem. **261**: 6564-6570
- Wen, D.; Corina, K.; Chow, E. P.; Miller, S.; Janmey, P. A.; Pepinsky, R. B. (1996)
The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure.
Biochemistry **35**: 9700-9709
- Wemhoff, J.L.; Church, F.C. (1999)
Role of acidic residues in the second acidic domain of heparin cofactor II (HCII) during inhibition of thrombin.
Blood **94**: Suppl. 1 458a
- Wernicke, D.; Will, H. (1992)
Generation of recombinant CHO(dhfr⁻) cell lines by single selection for dhfr⁺ transformants.
Anal. Biochem. **203**: 146-150
- Westrup, D.; Ragg, H. (1994)
Secondary thrombin-binding site, glycosaminoglycan binding domain and reactive center region of leuserpin-2 are strongly conserved in mammalian species.
Biochim. Biophys. Acta. **1217**: 93-96
- Whinna, H. C.; Blinder, M. A.; Szewczyk, M.; Tollefsen, D. M.; Church, F. C. (1991)
Role of lysine 173 in heparin binding to heparin cofactor II.
J. Biol. Chem. **266**: 8129-8132
- Whinna, H. C.; Church, F. C. (1994)
Characterization of a synthetic peptide from the glycosaminoglycan binding site of heparin cofactor II.
Letters in Peptide Science **1**: 3-8
- Whinna, H.C.; Choi, H.U.; Rosenberg, L.C.; Church, F.C. (1993)
Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin.
J. Biol. Chem. **268**: 3920-3924
- Whisstock, J.; Skinner, R.; Lesk, A. M. (1998)
An atlas of serpin conformations.
Trends Biochem. Sci. **23**:63-67
- Whisstock, J. C.; Skinner, R.; Carrell, R. W; Lesk, A. M. (2000)
Conformational changes in serpins. II. The native and cleaved conformations of α_1 -antitrypsin.
J. Mol. Biol. **296**: 685-699
- Wray, G.A.; Levinton, S.J.; Shapiro, L.H. (1996)
Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoa phyla.
Science **274**: 568-573
- Wright, H.T. (1993)
Introns and higher-order structure in the evolution of serpins.
J. Mol. Evol. **36**: 136-143
- Wright, H.T.; Scarsdale, J.N. (1995)
Structural basis of serpin inhibitor activity.
Proteins **22**: 210-225
- Wunderwald, P.; Schrenk, W.J.; Port, H. (1982)
Antithrombin BM from human plasma: An antithrombin binding moderately to heparin.
Thromb. Res. **25**:177-191
- Xu, Y.; Szoka, F.C. jr (1996)
Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection.
Biochemistry **35**: 5616-5623

- Yamanaga, K.; Yuuki, T.; Tsukada, M.; Koshiba, H.; Nakajima, T.; Takechi, K.; Nakamura, N. (2000)
Heparin cofactor II inhibits thrombus formation in a rat thrombosis model.
Thromb. Res. **98**: 95-101
- Ye, G.N.; Daniell, H.; Sanford, J.C. (1990)
Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts.
Plant Mol. Biol. **15**: 809-19
- Zehnder, J.L.; Galli, S.J. (1999)
Mast-cell heparin demystified.
Nature **400**: 714-715
- Zhang, G. S.; Mehringer, J. H.; van Deerlin, V. M.; Kozak, C. A.; Tollefsen, D. M. (1994)
Murine heparin cofactor II: purification, cDNA sequence, expression, and gene structure.
Biochemistry **33**: 3632-3642
- Zhou A.; Jiang, X.; Xu, X. (1997)
Improved alkaline lysis method for rapid isolation of plasmid DNA.
Biotechniques **23**: 592-594
- Zimmermann, U.; Vienken, J. (1982)
Electric field-induced cell-to-cell fusion.
J. Membr. Biol. **67**: 165-182
- Zou, Z.; Anisowicz, A.; Hendrix, M. J.; Thor, A.; Neveu, M.; Sheng, S.; Rafidi, K.; Seftor, E.; Sager, R. (1994)
Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells.
Science **263**: 526-529

H Anhang

H.1 cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII

1	Gly Ser Lys Gly Pro Leu Asp Gln Leu Glu Lys Gly Gly Glu Thr Ala Gln Ser Ala Asp GGG ACC AAA GGC CCG CTG GAT CAG CTA GAG AAA GGA GGG GAA ACT GCT CAG TCT GCA GAT	GT	2	301	Val Val Lys Val Ser Met Met Gln Thr Lys Lys Gly Asp Phe Leu Ala Ala Asn Asp Gln Glu GTA GTT AAG GTT TCC ATG ATG CAG ACC AAG GGG AAC TTC CTC GCA GCA AAT GAC CAG GAG	320
21	Pro Gln Trp Glu Gln Leu Asn Lys Asn Leu Ser Met Pro Leu Leu Pro Ala Asp Phe CCC CAG TGG GAG CAG TTA AAT AAC AAA AAC CTG AGC ATG CCT CTT CTC CCT GCC GAC TTC	40	330	Leu Asp Cys Asp Ile Leu Gln Leu Glu Tyr Val Gly Gly Ile Ser Met Leu Ile Val Val CTG GAC TGC GAC ATC CTC CAG CTG GAA TAC TAC GTG GGG ATC AGC ATG CTA ATT GTG GTC	340	
41	Lys Lys Glu Asn Thr Val Thr Asn Asp Trp Ile Pro Glu Gly Glu Asp Asp Thr CAC AAG GAA AAC ACC GTC ACC GAC TGG ATT CCA GAG GGG GAG GAG GAC GAC TAT	60	350	Pro His Lys Met Ser Gly Met Lys Thr Leu Glu Ala Gln Leu Thr Pro Arg Val Val Glu CCA CAC AAG ATG TCT GGG ATG AAG ACC CTC GAA CCG GAA CTG ACA CCC GGG GTG GTG GAG	1082	
61	Leu Asp Leu Glu Lys Ile Phe Ser Glu Asp Asp Thr Ile Asp Ile Val Asp Ser Leu CTG GAC CTG GAG AAG ATA TTC AGT GAA GAC GAC TAC ATC GAC ATC GTC GAC AGT CTG	80	370	Arg Trp Gln Lys Ser Met Thr Asn Arg Thr Arg Glu Val Leu Leu Pro Lys Phe Lys Leu AGA TGG CAA AAA AGC ATG ACA AAC AGA ACT CGA GAA GTG CTT CTC CGS AAA TTC AAG CTG	1142	
81	Ser Val Ser Pro Thr Asp Ser Asp Val Ser Ala Gly Asn Ile Leu Gln Leu Phe His Gly TCA GTT TCC CCG ACA GAC TCT GAT GTG AGT GCT GGG AAC ATC CTC CAG CTT TTT CAT GGC	100	390	Glu Lys Asn Tyr Asn Leu Val Glu Ser Leu Lys Leu Met Gly Ile Arg Met Leu Phe Asp GAG AAG AAC TAC AAT CTA GTG GAG TCC CTG AAG TTG ATG GGG ATC AGG ATG CTG TTT GAC	1202	
101	Lys Ser Arg Ile Gln Arg Leu Asn Ile Leu Asn Ala Lys Phe Ala Phe Asn Leu Tyr Arg AAG AGC CGG ATC CAG CGT CTT AAC ATC CTC AAC GCC AAG TTC GCT TTC AAC CTC TAC CGA	120	410	Lys Asn Gly Asn Met Ala Gly Ile Ser Asp Gln Arg Ile Ala Ile Asp Leu Phe Lys His AAA AAT GGC AAC ATG GCA GGC ATC TCA GAC CAA AAG ATC GCC ATC GAC CTG TTC AAG CAC	1262	
121	Val Leu Lys Asp Gln Val Asn Thr Phe Asp Asn Ile Phe Ile Ala Pro Val Gly Ile Ser GTG CTG AAA GAC CAG GTC AAC ACT TTC GAT AAC ATC TTC ATA GCA CCC GTT GGC ATT TCT	140	430	Gln Gly Thr Ile Thr Val Asn Glu Glu Gly Thr Gln Ala Thr Thr Val Thr Val Gly CAA GGC ACG ATC ACA GTG AAC GAG GAA GGC ACC CAA GCC ACC ACT GTG ACC AGG GTG	1322	
141	Thr Ala Met Gly Met Ile Ser Leu Gly Leu Lys Gly Thr His Glu Gln Val His Ser ACT GCG ATG GGT ATG ATT TCC TTA GGT CTG AAG GGA GAG ACC CAT GAA CAA GTG CAC TCG	160	450	Phe Met Pro Leu Ser Thr Gln Val Arg Phe Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Leu Ile TTC ATG CCG CTG TCC ACC CAA GTC CCG TTC ACT GTC GAC CGC CCC TTT CTT TTC CTC ATC	1382	
161	Ile Leu His Phe Lys Asp Phe Val Asn Ala Ser Ser Lys Tyr Glu Ile Thr Thr Ile His AIT TTG CAT TTT AAA GAC TTT GTT ANT GCC AGC AGC ANG TAT GAA ATC ACG ACC ATT CAT	180	470	Tyr Glu His Arg Thr Ser Cys Leu Leu Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Ser Arg Ser TAC GAG CAC CGC ACC AGC TGC CTG CTC TTC ATG GGA AGA GTG GCC AAC CCC AGC AGG TCC	1442	
181	Asn Leu Phe Arg Lys Leu Thr His Arg Leu Phe Arg Asn Phe Gly Tyr Thr Leu Arg AAT CTC TTC CGT AAG CTG ACT CAT CGC CTC TTC AGG AGG AAT TTT GGG TAC ACA CTG CCG	200	xxx	TAG AGGTGGAGGTCTFAGGTGCTGTAAGTGCCCTTGGGGGCCCCCTCATTTTGTTCATTCACCAACGAGACAGAGA	1520	
201	Ser Val Asn Asp Leu Tyr Ile Gln Lys Gln Phe Pro Ile Leu Leu Asp Phe Lys Thr Lys TCA GTC AAT GAC CTT TAT ATC CAG ANG CAG TTT CCA ATC CTG CTT GAC TTC AAA ACT AAA	220	TGTTCTGGCATCATTTTACGTAGTTTACGGCTACCAATCTGAAITTCGAGGGCCCATATGAGAGGCTTAGAAAGCACAAG	1599		
221	Val Arg Glu Tyr Tyr Phe Ala Glu Ala Gln Ile Ala Asp Phe Ser Asp Pro Ala Phe Ile GTA AGA GAG TAT TAC TTT GCT GAG GCC CAG ATA GCT GAC TTC TCA GAC CCT GCC TTC ATA	240	AAGAGGGTGTGTTGGAAATCAATTCGCACAATAGCCCATCTGTGTAAGCTCATAGAAAGTCACTGTACTGTAGTGTGTC	1678		
241	Ser Lys Thr Asn Asn His Ile Met Lys Leu Thr Lys Gly Leu Ile Lys Asp Ala Leu Glu TCA AAA ACC AAC AAC CAC ATC ATG ANG CTC ACC AAG GGC CTC ATA AAA GAT GCT CTG GAG	260	TGCTGTTACTAGAGGGTCTCAGCTCCCACTTTCACAGAAACCTGAGCAGGGGGTCTTAAGCACCTCCCGGCTCCGG	1757		
261	Asn Ile Asp Pro Ala Thr Gln Met Met Ile Leu Asn Cys Ile Tyr Phe Lys Gly Ser Trp AAT ATA GAC CCT GCT ACC CAG ATG ATG ATT CTC AAC TGC ATC TAC TTC AAA GGA TCC TGG	280	TGACCCCATCTTGGCACACCTGACTGCTGTGTCTCACTCAAGCCCTTTCACCAAGCCCTCACTCTGAATACCAAGCACAGAA	1836		
281	Val Asn Lys Phe Pro Val Glu Met Thr His Asn His Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Glu GTG AAT AAA TTC CCA GTG GAA ATG ACA CAC AAC CAC AAC TTC CGG CTG AAT GAG AGA GAG	300	ATGAGTGGTGTGACTAATTTCTTACCTCTCCCAAGGAGGGGTACACAACTAGCACCATTCTTTGATGTCCAGGGGAAGC	1915		
			CACCTCAAGACATATGAGGGGTGCCCTGGCTTAATGTTAGGGGTTTAAITTTTTCAAAGCCCTGACCTTTTCAAAATCCATGA	1994		
			TGATGCCATCATGTCCTCTCCCTGCTGCTCCCTGTGACCTGGAGACAGATGTGTGCCATGTCTCCCATACTAGAGAT	2073		
			AAATAAAT 2081			

Abbildung 63: cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII

aus: Ragg, H. (1986) A new member of the plasma protease inhibitor family. *Nucleic Acids Res.* **14**: 1073-1088

H.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ak	Antikörper
<i>AlwNI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
Amp	Ampicillin
<i>AocI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
AP	alkalische Phosphatase
APC	Aktiviertes Protein C
AS	Aminosäure(n)
AT	Antithrombin
ATCC	American Type Culture Collection (http://www.atcc.org)
ATP	Adenosintri-phosphat
<i>BamHI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat
BGH	bovines Wachstumshormon (engl.: bovine growth hormone)
<i>bla</i>	Gen der β -Laktamase, welches Resistenz gegen Ampicillin und Carbenicillin vermittelt
Bp	Basenpaare (engl.: basepairs)
BSA	Rinder Serum Albumin (engl.: bovine serum albumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (engl.) auch: copy-DNA
CHO	chinese hamster ovary (engl.) Zelllinie aus Goldhamster
CHO DUKX B1	CHO Zelllinie (ATCC Nr.: CRL-9010)
CMV	Cytomegalovirus
Col E1 ori	bakterieller Plasmid-Replikationsursprung
COS	CV1 Origin SV40, Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze
COS7	COS-Zelllinie (ATCC Nr.: CRL-1651)
CTP	Cytosintri-phosphat
d	Desoxy-
Da	Dalton, Masseneinheit; entspricht $\frac{1}{12}$ der Masse eines C-Atoms. $1\text{Da} \approx 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
dcm	DNA-Methylase, die Cytosinreste in der Sequenz CC(A/T)GG methyliert
dd	Didesoxy-
dH ₂ O	demineralisiertes, autoklaviertes Reinstwasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
<i>DraI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl.: double stranded DNA)
DTE	Dithioeritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence (engl.)
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymimmunoassay (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii (lat.: und andere)
f	Femto-, 10^{-15}
f1 ori	Replikationsursprung des f1-Phagen
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (engl.)
g	Gramm
G	Guanosin

g	Erdbeschleunigung, $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$
G418	Aminoglykosid-Antibiotikum, welches die Funktion der eukaryotischen S80 Untereinheit der Ribosomen stört.
GAG / GAGs	Glycosaminoglycan / Glycosaminoglycane
GSSG	oxidiertes Gluthathion
GTP	Guanosintriphosphat
HCII	Heparinkofaktor II (engl.: Heparin Cofactor II)
HepG2	human Hepatozyten-Karzinom-Zelllinie (ECACC Nr.: 85011430)
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
HIV	humanes Immundefizient Virus
HMW	Proteingrößenmarker HMW (engl.: high molecular weight)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horse radish peroxidase)
IAM	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
Ins/Trans	Insulin-Transferrin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITP	Inosintriphosphat
k	Kilo-, 10^3
k_2	Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, Einheit: $\text{M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lac Z</i>	Gen, welches für β -Galactosidase kodiert
LM VIII	DNA-Längenstandard VII (engl.: DNA Molecular Weight Maker VIII)
LM X	DNA-Längenstandard 1 kB DNA Leiter (LM X)
LMW	Proteingrößenmarker LMW (engl.: low molecular weight)
LRP	lipoprotein-receptor-related protein (engl.)
M	Molar
m	Milli-, 10^{-3}
μ	Mikro-, 10^{-6}
M13 ori	Replikationsursprung des Phagen M13
MCS	multiple Klonierungsstelle (engl.: multiple cloning site)
min	Minuten
Mops	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger ribonucleic acid)
<i>MscI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
MWCO	Trenngrenze einer Filtrationsmembran in kDa (engl.: molecular weight cutoff)
n	Nano-, 10^{-9}
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<i>NcoI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
<i>NdeI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
NTP	Nukleosidtriphosphat
$\text{OD}_{x \text{ nm}}$	Optische Dichte einer Lösung bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung eines Vektors (engl.: origin)
p	Pico-, 10^{-12}
p.A.	zur Analyse (lat.: pro analysis)
PAA	Polyacylamid
PAI-1	Plasminogen-Activator-Inhibitor-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PEG8000	Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 8000 Da
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
<i>PflMI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
pMB1 ori	bakterieller Replikationsursprung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PstI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
<i>PvuII</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
pWTBii	Shuttle Vector pCDM8 mit HCII-cDNA in <i>SacI</i> -Schnittstelle

<i>RcaI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
<i>RsaI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
RT	Raumtemperatur
S2A	Strang 2 von β -Faltblatt A
SA	Streptavidin
<i>SaII</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
SAP	Shrimps alkalische Phosphatase
<i>ScaI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
Serpin	Serin-Protease-Inhinitor
<i>SmaI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
<i>SrfI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: single stranded DNA)
sup F	amber-Suppressor tRNA-Gen
SV40 ori	Replikationsursprung des SV40-Virus
T	Thymidin
T175-Flaschen	Zellkulturflaschen mit einer Kultivierungsoberfläche von 175 cm ²
T7-Promotor	Promotor des Bakteriophagen T7
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	tissue factor (engl.: Gewebefaktor)
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (engl.)
TMB	Tetramethylbenzidin
t-PA	Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator (engl.: tissue-type-plasminogen-activator)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units
ü.N.	über Nacht
u-PA	Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator (engl.: urokinase-type-plasminogen-activator)
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopoeia (engl.)
UV	untraviolett
v/v	Volumen je Volumen (engl.: volume per volume)
VLDLR	very-low-density-lipoprotein-receptor (engl.)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)
w/w	Gewicht pro Gewicht (engl.: Weight per weight)
WT	Wildtyp
<i>XhoI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1
<i>XmnI</i>	Restriktionsendonuklease siehe D.1.4.1

H.3 Aminosäuren und ihre Abkürzungen

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

Tabelle 31: Aminosäuren und ihre Abkürzungen im 3-Buchstabencode bzw. 1-Buchstabencode

H.4 Übersicht über untersuchte rekombinate HCII-Varianten

HCII-Variante	Wildtypamino­säuren bzw. geänderte Aminosäuresequenzen der HCII-Varianten
Wildtyp-HCII	P52, G54, S68, F195, C273, C323, C467
HCII F195C	P52, G54, S68, F195C , C273, C323, C467
HCIIΔC	P52, G54, S68, F195, C273S, C323S, C467S
HCIIΔC F195C	P52, G54, S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIΔC F195C/P52C	P52C , G54, S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIΔC F195C/G54C	P52, G54C , S68, F195C, C273S, C323S, C467S
HCIIΔC F195C/S68C	P52, G54, S68C, F195C, C273S, C323S, C467S

Tabelle 32: Merkmale der untersuchten HCII-Varianten. Der jeweils zuerst angegebene Buchstabe kennzeichnet die Ursprungsamino­säure, die Zahl die Aminosäureposition im reifen HCII und der 2. Buchstabe, sofern vorhanden, die neu eingeführte Aminosäure. (Beispiel: **F195C**: Phe195 mutiert zu Cys195) (siehe auch H.1)

H.5 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Brinkmeyer S., Ragg H. (1999)

Evidence for allosteric activation of heparin cofactor II in the presence of glycosaminoglycans.

Biol. Chemistry 380 (Suppl.): 140.

Brinkmeyer S., Eckert R., Ragg H. (2001)

Evidence for allosteric activation of heparin cofactor II in the presence of heparin or dermatan sulfate.

Thromb. Haemost.: im Druck

Brinkmeyer S., Ragg H.

Allosteric activation of heparin cofactor II in the presence of heparin or dermatan sulfate: demonstration of the mechanism using a reversible molecular switch.

in Vorbereitung

H.6 Bildungsweg

Persönliche Daten:

Name: Stephan Brinkmeyer

Anschrift: Schmiedestr. 13
32051 Herford

Geburtstag: 19. Nov. 1968

Geburtsort: Herford

Familienstand: ledig

Schulbildung:

Sept. 1975 - Juli 1979	Grundschule Stiftberg in Herford
Sept. 1979 - Juni 1988	Königin-Mathilde-Gymnasium der Stadt Herford
	Abschluß: Abitur (9. Juni 1988)

Hochschulstudium:

Okt. 1989 bis März 1996 Biologie (Diplom) an der Universität Bielefeld

Diplomarbeit "Entwicklung einer Nested-Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion für den Nachweis von Infektionen mit humanpathogenen Herpesviren"

Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Georgstr. 11
32545 Bad Oeynhausen

Abschluß: Diplom (15. März. 1996)

Promotion:

seit Mai 1996 AG zelluläre Genetik
Technische Fakultät der Universität Bielefeld

Titel der Dissertation: "Experimente zur Aktivierung von Heparinkofaktor II durch Heparin und Dermatansulfat unter Verwendung eines reversiblen molekularen Schalters."

Danksagung

Herrn Professor Dr. Ragg danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Egal wieviel Arbeit sich vor ihm auftürmte, er versuchte sich immer Zeit zu nehmen und trug durch seine Vorschläge, Anregungen und Diskussionsbereitschaft wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Besonders zu schätzen gelernt habe ich seinen "Literaturservice", auch wenn dies zu teilweise unangenehm großen Papierstapeln auf dem Schreibtisch und entsprechend großem schlechten Gewissen führte.

Herrn Professor Dr. Hinssen von der Fakultät für Biologie danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Sofern ich mich nicht verzählt habe ist dies bereits das dritte mal binnen zwei Jahren, daß er sich "breitschlagen" ließ für Mitglieder unserer Arbeitsgruppe das Zweitgutachten zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Christoph Böhme, Ralf Eckert, Paul-Bertram Kamp, Annemarie Stathmann und Ulf Tödtnan für die praktischen Hilfen und die Einführung in Arbeitstechniken. Ebenso bedanken ich mich bei Hülya Gedikli, Eva Hellweg, Liselotte Yimng Djapa, Waraporn Komyod, Frauke Krepulat und Olaf Krüger für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Klima innerhalb der Arbeitsgruppe.

Nicht vergessen zu erwähnen möchte ich das gute Verhältnis und die gute Zusammenarbeit mit den Arbeitskollegen auf der "dunklen Seite" (Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik von Professor Dr. Lehmann).

Frau Christine Metscher danke ich für das mehrfache geduldige Korrekturlesen der verschiedenen Versionen dieser Arbeit, sowie die moralische Aufrichtung, die in Phasen von "Pleiten, Pech und Pannen" von großer Hilfe war.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich dafür, daß sie mir dieses Studium ermöglicht haben.

...und schlußendlich

"In Büchern über naturwissenschaftliche Forschung ist viel die Rede von Faszination, Erkenntnisdurst und Begeisterung. Wenig liest man dagegen vom endlosen Pipettieren, verunglückten Experimenten, kleinlichen BAT-Verträgen oder schäbigen Stipendien. Jahrelange Arbeit führt häufig nur zu der Entdeckung, daß es in der eingeschlagenen Richtung nichts zu entdecken gibt. Zum Erfolg an der Laborbank gehören eben Glück, Fleiß, Einfallsreichtum, gute Betreuung und Intelligenz – in dieser Reihenfolge. So werden Ihre Abenteuer denen des irrenden Ritters gleichen: Täglich und sonntäglich geht es auf der klapprigen Rosinante in ein Schloß, in dem der König Professor heißt, die Mühen groß, die Resultate verwirrend, das Essen schlecht und Rückschläge die Regel sind. Doch festigt diese Zeit der Prüfung Ihre Seelenstärke. Aus den Abgründen der Verzweiflung steigen sie auf zur Ebene abgeklärter Wurstigkeit, wo graue rauhe Straßen zu scheinbar endlosen Horizonten führen.

Lassen sie sich also nicht entmutigen! Auch die anderen rackern sich erfolglos ab; es ist normal, daß sich erstmal kein Ergebnis blicken läßt. Halten Sie durch! – oder lernen sie gleich einen vernünftigen Beruf."

aus:

Hubert Rehm

Der Experimentator:

Proteinbiochemie/Proteomics

3. Auflage (2000)

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin