

PROTEININTERAKTIONEN DER
VITAMIN K EPOXID REDUKTASE PROTEINE
VKORC₁ UND VKORC_{1L1}



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIAN-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON
ANNE SCHAAFHAUSEN
AUS FRANKFURT AM MAIN

WÜRZBURG, DEZEMBER 2010

EINGEREICHT AM:

BEI DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

VORSITZENDER:

1. GUTACHTER: Prof. Dr. rer. nat. C. R. MÜLLER-REIBLE

2. GUTACHTER: Prof. Dr. rer. nat. G. KROHNE

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	IV
Summary	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die Blutgerinnung.....	2
1.2 Vitamin K.....	6
1.2.1 Der Vitamin K Zyklus.....	8
1.2.2 Die Vitamin K Epoxid Reduktase.....	9
1.3 Die γ -Glutamyl-Carboxylase und die VKD-Proteine.....	15
1.4 Vitamin K und die Blutgerinnung	19
1.4.1 Coumarine inhibieren VKOR	19
1.4.2 Calumenin - ein VKOR Regulator	22
1.4.3 Vitamin K-abhängige klinische Phänotypen	23
1.4.4 Erbllich bedingter Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungs-faktoren.....	23
1.4.5 Erworbene Vitamin-K-Defizienz	24
1.5 Warfarin Embryopathie und Chondrodysplasia punctata.....	24
1.6 VKOR Interaktionen.....	26
1.6.1 Das Split-Ubiquitin-System.....	27
1.7 Zielsetzung der Arbeit	30
2. Material und Methoden.....	31
2.1 Material	31
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	31
2.1.2 Puffer und Lösungen	31
2.1.3 Oligonukleotide	31
2.1.4 Vektoren	34
2.1.5 Zelllinien	41
2.1.6 Bakterienstämme	41
2.1.7 Hefestamm	41
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41

2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.3	DNA-Aufreinigung.....	45
2.2.4	Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienkultur	46
2.2.5	Präparative Plasmidisolierung aus Hefekulturen	46
2.2.6	Klonierung.....	46
2.2.7	DNA- Sequenzierung nach Sanger.....	49
2.3	Zellbiologische und enzymologische Methoden	50
2.3.1	Bakterienkultur	50
2.3.2	Hefekultur	51
2.3.3	Kultivierung von Säugerzelllinien	52
2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	53
2.3.5	Transfektion von Säugerzellen	54
2.3.6	Epoxidierung von Vitamin K-Chinon	54
2.3.7	VKOR-Assay	55
2.3.8	Kinetik von VKORC1L1.....	57
2.3.9	Protein Kolokalisation mittels indirekter Immunofluoreszenz	58
2.4	Proteinbiochemische Methoden	59
2.4.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	59
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.4.3	Western Blot	60
2.4.4	Immundetektion.....	61
2.4.5	Ko-Immunpräzipitation	62
2.4.6	Split-Ubiquitin-System.....	63
3.	Ergebnisse	65
3.1	VKORC1L1 - Kinetik.....	65
3.1.1	VKOR-Assay-Optimierung.....	65
3.1.2	Michaelis-Menten Kinetik.....	70
3.1.3	Vitamin K1 und K2-Epoxid als konkurrierende Substrate.....	73
3.1.4	Hemmstudien von VKORC1L1 mit Warfarin	73
3.1.5	Mutagenese - Studien.....	77
3.2	Suche nach Interaktionspartnern der Vitamin K Enzyme VKORC1, VKORC1L1 und GGCX mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems.....	80
3.2.1	Funktionaler Test der „Köder“- Konstrukte	80

3.2.2	Screen der Leberzell-spezifischen cDNA-Bank	84
3.2.3	Köder-Abhängigkeits Test.....	91
3.3	Ko-Immunpräzipitation	93
3.3.1	Expressionstest.....	94
3.3.2	Ko-Immunpräzipitationen.....	96
3.4	Kolokalisation von VKORC1 und den möglichen Interaktionspartnern	99
4.	Diskussion.....	104
4.1	Kinetik von VKORC1L1.....	104
4.1.1	Michaelis-Menten-Kinetik.....	105
4.1.2	Wirkung von Warfarin auf die VKORC1L1-Aktivität	107
4.1.3	Mutagenesestudien	109
4.2	Proteininteraktionen	112
4.2.1	VKORC1 Interaktionspartner.....	113
4.2.2	Überschneidungen der Ergebnisse für VKORC1 und VKORC1L1	126
4.2.3	VKORC1L1-Interaktionspartner.....	127
4.2.4	γ -Glutamyl-Carboxylase- Interaktionspartner.....	128
4.3	Ausblick	129
5.	Anhang.....	131
5.1	Literaturverzeichnis.....	131
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	157
5.3	Tabellenverzeichnis.....	160
5.4	Abkürzungsverzeichnis	161
	Danksagung.....	163
	Publikationen	164
	Erklärung.....	165

ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung des ersten Gens für den Vitamin K Epoxid-Reduktase-Komplex (VKORC1), dem Schlüssel-Enzym für die Regenerierung von Vitamin K, sind keine zusätzlichen Komponenten des Komplexes beschrieben worden. Die einzige bekannte Funktion von VKORC1 ist bislang die Reduktion von Vitamin K-2,3-Epoxid, welches bei der post-translationalen Carboxylierung von Proteinen als oxidiertes Kofaktor anfällt, und im sogenannten Vitamin K-Zyklus regeneriert wird. VKORC1 ist zugleich das Zielprotein antikoagulativer Medikamente der Coumarin-Gruppe, wie Warfarin oder Marcumar. Mutationen im VKORC1-Gen führen zu einem signifikanten Effekt auf die benötigte Coumarin-Dosis und die Stabilität der Hämostase (gemessen als INR-Wert) in der Thrombosebehandlung mit Antikoagulanzen.

Gleichzeitig mit VKORC1 wurde ein stark sequenz-homologes Protein identifiziert, das „VKORC1-like1“ (VKORC1L1) genannt wurde und dessen physiologische Funktion zu Beginn dieser Arbeit völlig unbekannt war.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit zwei Aspekten des Vitamin K-Stoffwechsels:

- A. Den enzym-kinetischen Eigenschaften und der subzellulären Lokalisation des VKORC1L1-Proteins sowie
- B. der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, die Interaktionspartner der beiden VKOR-Proteine sein können.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- A.1. Die enzym-kinetischen Untersuchungen zeigen starke Ähnlichkeiten zwischen VKORC1 und VKORC1L1: Beide Enzyme haben eine Vitamin K-Epoxidase- und -Reduktase-Aktivität, wobei die Affinitäten zu Vitamin K₂-Epoxid deutlich höher sind als die zu Vitamin K₁-Epoxid. Beide Enzyme sind durch Warfarin hemmbar und der Austausch der vermutlich am Elektronentransfer beteiligten Cysteine an homologen Positionen führt in beiden Proteinen zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität.
- A.2. Mittels Ko-Lokalisation konnte VKORC1L1 – wie VKORC1 – in der ER-Membran lokalisiert werden.

Folglich schließen wir, dass VKORC1L1 eine ähnliche Struktur, die gleiche zelluläre Lokalisation und zumindest *in vitro* auch eine VKOR-Aktivität hat und daher eventuell eine weitere Komponente des VKOR-Komplexes darstellen könnte. Allerdings sprechen gewichtige Argumente dagegen, dass beide Proteine funktionell austauschbar sind: Sowohl bei Patienten mit Mutationen in VKORC1 (VKCDF2-Erkrankung), als auch bei VKORC1-Knock-out Mäusen kann das intaktes VKORC1L1-Protein die inaktivierende Mutation im C1-Gen nicht kompensieren.

- B.1. Mit einem für Membranproteine adaptierten, modifizierten Yeast-Two-Hybrid Screen (Split-Ubiquitin-System) konnten mit VKORC1 und VKORC1L1 als Köder 114 Proteine aus einer Leber-cDNA-Bank als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Davon wurden 6 Proteine aufgrund ihrer Trefferhäufigkeit und funktioneller Überlegungen mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitationsexperimenten und Ko-Immünlokalisierung näher untersucht. Interessanterweise zeigen die beiden Trefferlisten starke Überschneidungen.
- B.2. Es konnte eine *in vitro*- Interaktion von VKORC1 mit sich selbst und mit VKORC1L1 nachgewiesen werden, die bisher nicht bekannt war. Dies könnte auf der hohen Sequenz- und Struktur-Homologie der beiden Proteine beruhen, führt aber auch zu neuen Hypothesen bezüglich des Vitamin K-Stoffwechsels.
- B.3. Die Interaktion von VKORC1 und dem „stress-associated endoplasmic reticulum protein 1“ (SERP1) bringt Vitamin K in Zusammenhang mit oxidativem Stress. Dazu passen auch die neuesten Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Johannes Oldenburg (vormals Würzburg, jetzt Bonn) zur Funktion von VKORC1L1, die eine protektive Rolle von Vitamin K beim Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffverbindungen nahe legen. Ob und wie Vitamin K und VKORC1L1 einen neuen Schutzmechanismus gegen Sauerstoffradikale bilden bedarf weiterer Untersuchungen.
- B.4. Ferner wurde eine Interaktion zwischen VKORC1 und dem „Emopamil-binding-protein“ (EBP) nachgewiesen. Mutationen in EBP führen zu der seltenen genetischen Krankheit Chondrodysplasia punctata. Die Ähnlichkeit der Symptomatik zwischen Chondrodysplasia punctata und der sogenannten Warfarin-Embryopathie, die durch überhöhte Dosierung von Coumarinen während der Schwangerschaft verursacht wird, legt einen Zusammenhang zwischen Vitamin K- und dem Kalziumstoffwechsel nahe.

B5. In den Ko-Immunpräzipitationsexperimenten nicht bestätigt haben sich die initial positiven Proteine Protein-Disulfid-Isomerase (PDIA6), CD63, und Fibrinogen-Gamma (FGG). Ein PDI-Protein war in der Literatur als Elektronendonator für VKORC1 diskutiert worden. CD63, ein Mitglied der Tetraspanin-Proteinfamilie, bildet als Glykoprotein Zelloberflächen Netzwerke aus und ermöglicht Protein-Interaktionen. FGG ist eine Untereinheit des Fibrinogens und damit das einzige hier identifizierte Protein aus der Blutgerinnung.

Die Ergebnisse geben Hinweise auf neue Funktionen der VKOR-Proteine beim Schutz vor oxidativem Stress und in der Verbindung zum Kalzium-Stoffwechsel. Beide Aspekte bedürfen weiterführender Untersuchungen. Im Hinblick auf diese neuen Funktionen wäre auch eine kritische Betrachtung der übrigen 85 primären Treffer des Split-Ubiquitin-Screens sinnvoll.

SUMMARY

Since the first gene of the vitamin K epoxide reductase complex (VKORC1) - the key enzyme for the regeneration of vitamin KH_2 - has been discovered, no more components of the complex have been described. To date, the only known function of VKORC1 is the reduction of vitamin K-2,3-epoxide (VKO) in the vitamin K cycle. VKO plays a role as an oxidative cofactor during post-translation carboxylation. VKORC1 is also the target protein of anticoagulant drugs of the coumarin type (e.g. warfarin or marcumar). Genetic variants in VKORC1 have recently been shown to significantly affect the coumarin dose and the stability of haemostasis (measured as INR level) during thrombosis treatment.

Simultaneously with VKORC1, a homologous protein called VKORC1-like1 (VKORC1L1) was identified. The physiological function of VKORC1L1 was unknown at the beginning of this thesis.

The present thesis focuses on two aspects:

- A. Kinetic properties and subcellular localization of VKORC1L1-protein as well as
- B. identification and characterization of potential interaction partners of VKORC1 and VKORC1L1, respectively.

The results could be summarised as follows:

- A.1. Kinetic studies revealed a high similarity of VKORC1 and VKORC1L1: Both VKOR-proteins have shown a VKR-activity in our assay and a higher affinity for Vitamin K2-epoxid than for Vitamin K1-epoxid. Both enzymes could be inhibited by warfarin and the exchange of homologous Cysteins leads to an almost complete loss of function for both proteins.
- A.2. Localisation studies identified VKORC1L1 in the ER when co-expressed in HeLa cells with VKORC1.

Accordingly, we suggest that VKORC1L1 has a similar function, localisation and structure as VKORC1 and therefore becomes a potential component of the VKOR-complex. Nevertheless, important arguments lead to the fact that both proteins are not interchangeable as neither patients with VKCDF2 nor VKORC1-knock out mice could be counterbalanced by VKORC1L1.

-
- B. Using the split-ubiquitin-system, a method based on yeast two-hybrid system which is capable to investigate membrane-proteins, 114 potential interactions candidates for VKORC1 and VKORC1L1 were found in a human adult liver cDNA library screen. 5 of them were further investigated using co-immunoprecipitation and co-localisation studies. Interestingly, various similar hits could be detected for both proteins.
- B.1. For the first time we were able to show an *in vitro*-interaction of VKORC1 with itself and the homologues protein VKORC1L1. This might be due to the high level of homology between the two proteins but also leads to a new hypothesis in respect to the vitamin K metabolism.
- B.2. The interaction of VKORC1 and “stress-associated endoplasmatic reticulum protein 1” (SERP1) connects vitamin K with oxidative stress. This is in accordance with new results from the group of J. Oldenburg (formerly Würzburg, now Bonn). They postulate an antioxidant role of VKORC1L1. Whether VKORC1L1 and vitamin K have an antioxidative effect needs to be solved in further studies.
- B.2. Furthermore, we showed an interaction between VKORC1 and the “emopamil binding protein” (EBP). Genetic variants in EBP lead to a rare genetic disease chondrodysplasia punctata which can be considered a phenocopy of warfarin embryopathy, which is caused by medication of woman with coumarin derivatives during the first trimester of pregnancy. This interaction and the similar phenotypes suggest a connection between the vitamin K- and calcium metabolism.
- B.3. The following proteins, which were found using split-ubiquitin-system, could not be confirmed via co-immunoprecipitation: protein-disulfide-isomerase A6 (PDIA6), CD63, a member of the tetraspanin-family, and fibrinogen-gamma-chain (FGG). A PDI-form was proposed to provide electrons for reduction of the thioredoxin-like CXXC center in VKORC1. Tetraspanins are a large family of cell-surface proteins, which interact with proteins in a molecular network that is known as the tetraspanin web. FGG is the gamma component of fibrinogen, the only identified protein which is known to play a role in blood coagulation.

These results suggest new functions of VKOR-proteins related to protection against oxidative stress and a connection to the calcium-metabolism. Both aspects need to be analysed further. Therefore, it would make sense to analyse the remaining candidates found via split-ubiquitin-system with regard to these new functions.

1. EINLEITUNG

Vitamin K wurde bereits 1929 durch den dänischen Chemiker Henrik Dam als essentieller Nahrungsbestandteil entdeckt [1]. In den 1940er Jahren wurde seine Rolle als Kofaktor in der Blutgerinnung erstmals beschrieben [2-4]. In den 1960er Jahren wurde ein Prothrombin-ähnliches Molekül entdeckt, welches keine Blutgerinnungsaktivität und eine verringerte Fähigkeit zur Kalziumbindung zeigte. Es konnte als inaktive Form des Prothrombins, mit identischer Aminosäuresequenz und identischem Molekulargewicht identifiziert werden [5,6]. Die Umwandlung in die biologisch aktive Form benötigt einen Vitamin K-abhängigen Enzymkomplex [7,8].

In den 1970er Jahren wurde aufgeklärt, dass der Unterschied auf einer modifizierten Aminosäure beruht, die als γ -Carboxyglutaminsäure (Gla) bezeichnet wurde [9,10]. Die Carboxylierung von Proteinen, bei denen Glutamatreste (Glu) zu γ -Carboxyglutamatresten (Gla) umgewandelt werden, geschieht durch die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX). Dieses Enzym benötigt wiederum Vitamin K Hydrochinon als essentiellen Kofaktor [11].

Vitamin K Hydrochinon ist chemisch instabil und kann im Körper nicht gespeichert werden. Daher wurde ein zyklischer Reaktionsweg angenommen, der inaktives Vitamin K in die aktive Form reduziert [12-14]. Dieser Vitamin K-Zyklus ist seitdem Gegenstand der Forschung.

2004 wurde das Gen für eine Komponente des Vitamin K- Epoxidreduktase Komplexes (VKORC1) entdeckt. Dieses codiert ein Enzym, welches inaktives Vitamin K-Epoxid über Vitamin K-Chinon in die aktive Form, das Vitamin K-Hydrochinon, reduziert (siehe Abschnitt 1.2.2). VKORC1 ist gleichzeitig das Zielprotein von Coumarin-Derivaten, welche seit Jahrzehnten als Antikoagulationsmittel in der Medizin eine wichtige Rolle spielen [15,16]. Wie der Name schon sagt, ging man davon aus, dass es sich bei der Vitamin K-Epoxidreduktase um einen Multi-Enzym-Komplex handelt, dessen Gesamtreaktion bekannt ist [17,18], ohne dass aber die Proteinkomponenten im Einzelnen charakterisiert wären.

1.1 Die Blutgerinnung

Die Hämostase (Blutstillung, Blutgerinnung) ist ein lebensnotwendiger Prozess, um bei Endothelverletzungen und größeren Wunden den Wundverschluss zu sichern, und eine Voraussetzung für die Wundheilung zu schaffen. Hierbei kann man verschiedene Teilvorgänge der Hämostase unterscheiden, die jedoch in Wechselwirkung stehen.

Die primären Hämostase besteht aus einer spontanen arteriellen Hämostase, welche das „Einkrepeln“ von Arterien nach Querdurchtrennung und dadurch einen schnellen, provisorischen Verschluss bewirkt [19] und einer zellulären Hämostase, welche in der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an der beschädigten Stelle der Blutgefäße besteht und einen Thrombozyten-Thrombus bildet [20]. Zusätzlich werden Substanzen wie Serotonin freigesetzt, die eine Vasokonstriktion bewirken, was wiederum zu einem verminderten Blutfluss und -verlust führt [21].

Die sekundäre oder plasmatische Hämostase führt im Gegensatz zur primären, zu einem stabilen Wundverschluss, indem ein unlösliches Fibrinnetz gebildet wird [22]. Dies geschieht über eine kaskadenartige Zymogenaktivierung von mehreren Gerinnungsfaktoren [23]. Dadurch reichen sehr geringe Mengen eines auslösenden Faktors aus, um die Kaskade effektiv in Gang zu setzen. Die sekundäre Hämostase wird auch als eigentliche Blutgerinnung bezeichnet. (siehe Abbildung 1)

Man unterscheidet hier zwischen zwei Mechanismen zur Auslösung der Gerinnung, einem endogenen Weg, auch intrinsisches oder intravaskuläres System genannt und dem exogenen Weg, dem extrinsischen oder extravaskulärem System. [20]

Die Aktivierung des intravaskulären Systems kommt durch Kontakt des Blutes mit einer negativ geladenen Oberfläche zustanden, wie sie z.B. bei Gefäßverletzungen entstehen. Die Konformation von Faktor XII (Hagemann-Faktor) ändert sich daraufhin, wodurch die Serinprotease Kallikrein proteolytisch aktiviert wird [24-27]. Die Aktivierung wird zusätzlich durch das im Blutplasma vorhandene Kininogen unterstützt. Darauf folgend werden Faktor XI und IX aktiviert [28]. Die aktive Form von Faktor IX katalysiert als Serinprotease mit Hilfe von Faktor VIIIa (a steht für die aktive Form), Kalzium-Ionen und Phospholipiden der Thrombozyten die Aktivierung von Faktor X [20].

Das extravaskuläre System wird in Gang gesetzt, wenn aus verletztem Gewebe der Gewebefaktor (tissue faktor, TF) freigesetzt wird. Der Gewebefaktor, ein Lipidproteinkomplex wird auch als Faktor III oder Gewebethromboplastin bezeichnet [29]. Faktor III aktiviert in Anwesenheit von Kalzium-Ionen den Faktor VII [30]. Der Faktor VIIa aktiviert wiederum in Anwesenheit von Kalzium-Ionen und Phospholipiden als Cofaktoren Faktor X, welcher ebenfalls von Faktor IXa aktiviert werden kann. So ist dies die Schnittstelle beider Systeme [31]. Der Faktor Xa bildet mit aktivierten Faktor V, Kalzium-Ionen und Phospholipiden einen Komplex, der wiederum Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) spaltet [29]. Diese Reaktion wird durch positive Rückkopplung mit dem Komplex der Faktoren VIII und IX stark beschleunigt. Die Serinproteinase Thrombin interagiert mit dem hochmolekularen, löslichen Fibrinogen (Faktor I). Es bilden sich Fibrinmonomere aus, die anschließend unter Einwirkung des fibrinstabilisierenden Faktors XIIIa zu einem Polymer vernetzt werden. Durch das quervernetzte, stabile Fibringerinnsel erfolgt der Wundverschluss und dadurch die Blutstillung [22].

In Abwesenheit von Verletzungen muss die Gerinnung vermieden werden. Die dafür im Blutplasma enthaltene Proteine C, S und Z dienen als Inhibitoren der Blutgerinnung. Protein C wird durch Thrombin aktiviert, welches daraufhin einen Komplex mit Protein S, Kalzium-Ionen und Phospholipiden bildet. Das dadurch aktivierte Protein C inhibiert durch proteolytische Spaltung die aktivierten Faktoren Va und VIIIa und reguliert so die Blutgerinnung [32]. Protein Z wirkt als Kofaktor und hemmt ebenfalls durch proteolytische Spaltung den Faktor Xa [33].

Die im Blutplasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine, die entweder als Enzyme oder Kofaktoren wirken. Ihre Synthese findet fast ausschließlich in der Leber statt. Hiervon ausgenommen ist der von Willebrand- Faktor, der als Trägerprotein den Faktor VII vor vorzeitigem proteolytischen Abbau schützt [34].

Störungen in der plasmatischen Gerinnung werden als Koagulopathien bezeichnet. Sie können unterschiedliche Ursachen haben und beeinflussen die Blutgerinnungskaskade unterschiedlich stark.

Wird der Faktor XI bei einem Individuum nicht gebildet, hat dies keine bedeutende Störung der Gerinnung zur Folge, im Gegensatz zum Mangel an Faktor VIII bzw. IX, der zur Hämophilie A bzw. B führt. Bei der Hämophilie A handelt es sich um eine der häufigsten genetisch bedingten Erkrankungen mit einer Inzidenz von 1:5.000 während Hämophilie B weitaus seltener mit einer

Häufigkeit von 1:20.000 vorkommt [35,36]. Die beiden Formen der Hämophilie werden X-chromosomal rezessiv vererbt und führen zu einer verlangsamten Blutgerinnung und somit zu Blutungen in Gelenke und Muskulatur sowie in Weichteile und innere Organe [37]. Diese rezidivierenden Blutungen können durch die Substitution des jeweils verminderten Faktors behandelt werden [38]. Wird ein Hämophiler jedoch nicht mit den entsprechenden Gerinnungspräparaten behandelt, kommt es durch die Schädigung der Gelenke und die dadurch bedingten Muskelveränderungen (Atrophien, Verkürzungen) zu Gehbehinderung und Invalidität. Eine andere genetische Erkrankung, die die primäre Hämostase beeinträchtigt, ist das sogenannte von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, welche autosomal dominant wie auch rezessiv vererbt werden kann [39][40]. Die Ursache ist eine quantitative oder qualitative Störung des von-Willebrand-Faktors, wodurch die Adhäsion der Thrombozyten am Subendothel bei Gefäßverletzungen gestört ist [41].

Weitaus komplexere Erkrankungen sind allerdings die erworbenen Koagulopathien. Die plasmatische Gerinnung kann z. B. durch einen Vitamin-K-Mangel gestört werden. Dieser Mangel kann auf verschiedene Grunderkrankungen zurückgeführt werden und betrifft mehrere Faktoren des Blutgerinnungssystems. So führt dieser zu einer gestörten Synthese der Vitamin- K abhängigen Faktoren II, VII, IX und X sowie der Proteine C, S und Z [42].

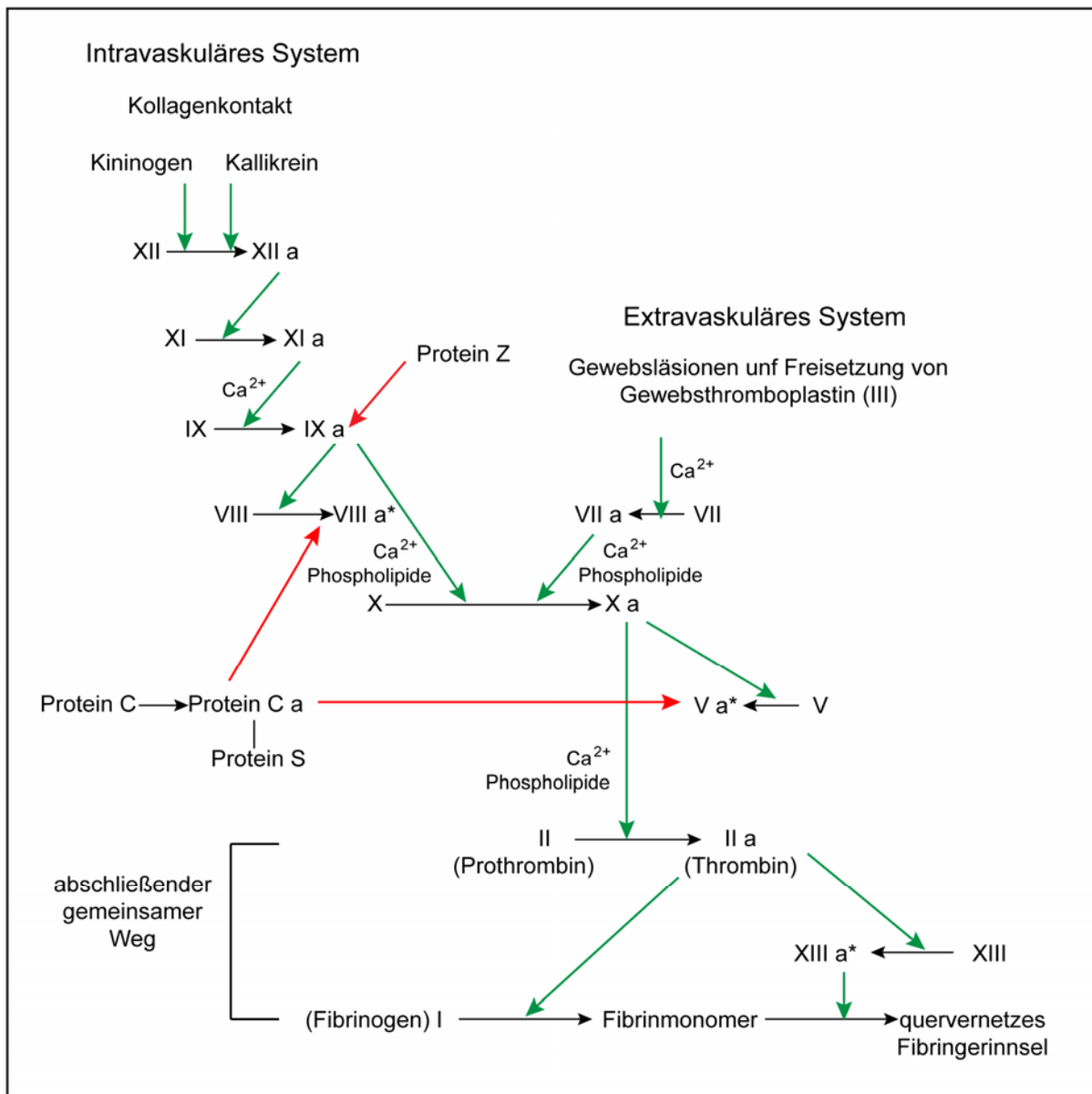


Abbildung 1: **Die Blutgerinnungskaskade**

Durch das Zusammenspiel des intravaskulären und des extravaskulären Systems bildet sich ein Fibringerinnsel. Das intravaskuläre System beginnt durch eine „Oberflächen“-Verletzung, die die Aktivierung von Faktor XII zur Folge hat. Das extravaskuläre System wird durch Verletzungen aktiviert, die den Gewebsfaktor freisetzen. Der aus Gewebsfaktor und Faktor VII bestehende Komplex aktiviert diesen Teil der Enzymkaskade. Die schwarzen Pfeile stellen die Transformation des Proenzym in die aktive Form dar (mit a gekennzeichnet). Die grünen Pfeile sollen die Aktivierung durch Proteolyse wiedergeben, während die roten Pfeile eine Hemmung der Blutgerinnung darstellen (nach Stryer L., Biochemie: [23]).

1.2 Vitamin K

Vitamine K (K für Koagulation) gehört zu den fettlöslichen Vitaminen [43,44]. Es ist in aktiver Form Kofaktor der Vitamin-K-abhängigen Carboxylierung [8]. Bei dieser Reaktion werden spezifische Glutamatreste in einigen speziellen Proteinen über die γ -Glutamylcarboxylase carboxyliert und so aktiviert. Durch diesen Mechanismus werden diese sogenannten Vitamin K-abhängigen (engl. Vitamin K dependent; VKD) Proteine aktiviert und dadurch verschiedene Prozesse gesteuert [45].

Vitamin K kommt in unterschiedlichen Formen vor. Sie leiten sich chemisch vom Grundgerüst des 2-Methyl-1,4-Naphthochinons (Vitamin K₃ oder Menadion) ab, einer in der Natur nicht vorkommenden synthetischen Substanz. Vitamin K hat einem unsubstituierten, aromatischen Ring und eine zweite Ringstruktur mit einer Methylgruppe und einer lipophilen Seitenkette, welche je nach Vitamin K- Form unterschiedlich lang sein kann und die Fettlöslichkeit und weitere Eigenschaften bestimmt [46] (siehe Abbildung 2). Insgesamt sind bis zu 100 Verbindungen mit Vitamin-K-Wirksamkeit bekannt, wobei für den menschlichen Stoffwechsel nur Vitamin K₁ und K₂ wichtig sind, während die anderen Naphthochinone keine praktische Bedeutung haben. Vitamin K₃ wird synthetisch hergestellt. Es kann allerdings als künstliches Pro-Vitamin K angewendet werden, da die fehlenden Seitenketten vom menschlichen Organismus ergänzt werden können [47].

Vitamin K₁, auch Phyllochinon genannt, kommt in unterschiedlichen Konzentrationen in Chloroplasten vor und spielt eine wichtige Rolle in der Photosynthese von Pflanzen [48,49].

Vitamin K₂, auch Menachinon genannt, wird von Bakterien unter anderem im menschlichen Darm synthetisiert. Es kann allerdings nur in geringen Mengen vom Körper absorbiert werden [50]. Die häufigste und potenteste Form ist Menachinon-4 mit einer lipophilen Seitenkette aus vier Isopreneinheiten (n=4). Dieses kann in geringen Mengen auch aus Phyllochinon gebildet werden [51], wobei der genaue Stoffwechselweg bisher nicht bekannt ist [52].

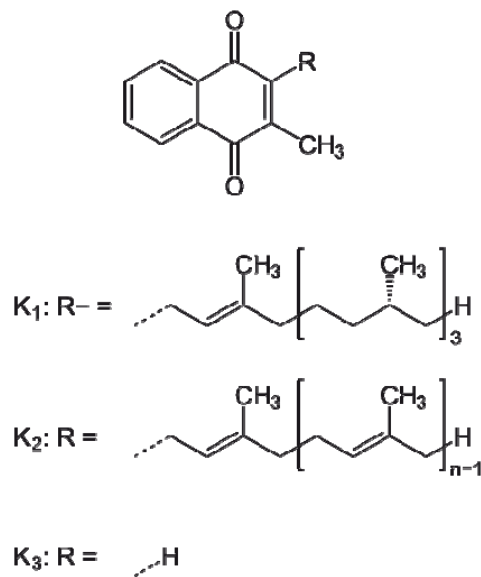


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Vitamin K Derivate

Vitamin K wurde 1929 von Henrik Dam bei Untersuchungen des Cholesterin-Stoffwechsels von Hühnern entdeckt [1]. Die Hühner erhielten eine fettarme Diät, was zu einer verzögerten Blutgerinnungsdauer, Blutungen und Anämie führte [53]. Die Arbeitsgruppe um Doisy isolierte und charakterisierte 1939 die chemische Struktur von Vitamin K [3].

Eine Frau sollte täglich 90 µg und ein Mann 120 µg Vitamin K₂ zu sich nehmen [54]. Vitamin K₂ kommt in frischem Obst und Gemüse vor [55]. Durch die Hitzestabilität des Naphthochinongerüsts ist das Vitamin sehr stabil bei der Zubereitung. Das fettlösliche Vitamin K₁ wird durch aktiven Transport in die Mukosazellen des oberen Dünndarms (Jejunum) zu 20-70% aufgenommen während Vitamin K₂ durch Diffusion in das Darmgewebe gelangt. Vitamin K wird dann an Chylomikronen und andere Lipoproteine gebunden, über die Lymphe in den *ductus thoracicus* und von dort aus über das Blut in die Organe transportiert, die Vitamin K benötigen [56]. Hierbei spielt die Leber die wichtigste Rolle. In dieser kann Vitamin K bis zu 14 Tagen gespeichert werden [57].

1.2.1 Der Vitamin K Zyklus

Im Jahr 1970 wurde von Bell und Matschiner die Vitamin K-Epoxid-Reduktase-Reaktion erstmals beschrieben [58]. Der Mechanismus ist bis heute Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

Vitamin K durchläuft einen Redoxzyklus, welcher die effiziente Rückgewinnung und Bereitstellung von reduzierten, biologisch aktiven Vitamin K Hydrochinon (KH_2) sicher stellt [59]. Dieser Zyklus findet im rauen endoplasmatischen Retikulum der hepatischen Mikrosomen statt [43].

Vitamin KH_2 dient als Kofaktor der γ -Glutamylcarboxylase, welche mittels CO_2 und Energie aus ATP ein VKD-Protein zu einem γ -carboxylierten VKD-Protein umwandelt. Während dieser γ -Carboxylierungsreaktion wird Vitamin KH_2 zu seinem 2,3-Epoxid umgewandelt. [60-62] Das Epoxid (KO) wird durch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR) zuerst zum Chinon (K) [63] und dann zum Hydrochinon (KH_2) reduziert [64,65]. Die zweite Reduktion kann wahrscheinlich auch durch die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase 1 erfolgen. Vitamin KH_2 kann daraufhin wieder als aktiver Kofaktor dienen und der Zyklus beginnt von vorne (siehe Abbildung 3).

Die Vitamin K Epoxid-Reduktase kann durch Coumarin-Derivate wie z.B. Dicoumarol, Phenprocoumon (Marcumar) und Warfarin inhibiert werden [15,16].

Bei der Reduktion mit zwei Elektronen durch die NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase 1 entstehen keine reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Im Gegenteil, man geht davon aus, dass die Zwei-Elektronen-Reduktion von Menadion einen Schutz gegen oxidativen Stress bewirkt [66,67].

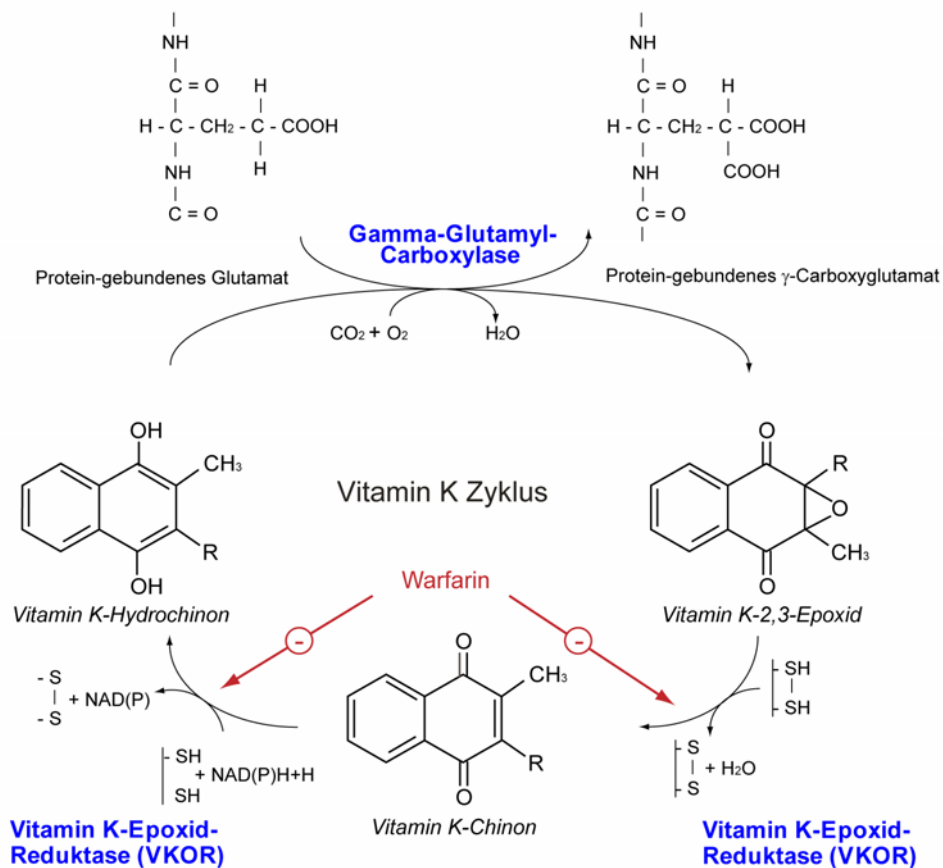


Abbildung 3: **Der Vitamin K-Zyklus**

Im Vitamin K-Zyklus wird Vitamin K- Hydrochinon, welches neben CO_2 und O_2 als essentieller Kofaktor der γ - Glutamylcarboxylase dient, recycelt. Die beiden Reduktionsschritte von Vitamin K-2,3-Epoxid über Vitamin K-Chinon zu Vitamin K-Hydrochinon werden von der warfarin-sensitiven Vitamin K-Epoxid Reduktase (VKOR) katalysiert. (nach Wallin und Martin, 1987)

1.2.2 Die Vitamin K Epoxid Reduktase

Lange Zeit wurde vermutet, dass es sich bei der VKOR um einen Multienzymkomplex handelt [17,18,68-70]. So postulierte Cain, dass eine mikrosomale Epoxidhydrolase und ein Mitglied der Glutathion-S-Transferase-(GST)-Familie die VKOR-Aktivität ausmachen [17]. Durch die Entdeckung des VKORC1- bzw. VKOR-Gens im Jahre 2004 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen, wurde dieses Modell allerdings entkräftet [15,16].

VKORC1, wie auch das durch Homologievergleiche gefundene paraloge VKORC1L1, sind *in vitro* alleine in der Lage, Vitamin KH_2 zu reduzieren. Hinzu kommt, dass beide Reaktionen Warfarin sensitiv sind [15]. Dabei kann VKOR sowohl die Reduktion vom 2,3-Epoxid zum Chinon als auch den Schritt vom Chinon zum Hydrochinon katalysieren [63,65].

Knockout-Mäuse ohne Epoxidhydrolase- bzw. ohne Gluthation-S-Transferase-Aktivität zeigten keine verminderte Blutgerinnung [71,72], während VKORC1-Knockout Mäuse innerhalb von 2 bis 20 Tagen nach Geburt durch erhebliche, überwiegend intracerebrale Blutungen sterben. Diese Blutungen kommen durch eine verminderte γ -Carboxylierung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren zustande und können durch orale Substitution von Vitamin K verhindert werden [73].

Die Elektronen, die für die Reduktion der Vitamin K-Epoxid-Reduktase benötigt werden, werden nach Wajih et al. durch eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) an das CXXC-Motiv im Redoxzentrum der VKOR übertragen. Die Elektronen stammen aus der dithiolabhängigen, oxidativen Faltung von neu synthetisierten Proteinen im ER, die an die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) gekoppelt werden (siehe Abbildung 3) [74,75].

Bei der PDI-Familie handelt es sich um thioredoxin-ähnliche Oxidoreduktasen. Sie kommen im Lumen des endoplasmatischen Reticulums vor und besitzen fünf Domänen (a, a', b, b', c) [76,77]. In Domäne a und a' findet sich ein CXXC- Motiv, welches als Thiol-Redoxzentrum fungiert. Die Domänen b und b' stellen die hydrophoben Bindungsstellen für die PDI-Substrate dar. Die PDI wird bei der Reaktion selbst reduziert. Die Reoxidation des PDI-Redoxzentrums ist wiederum an die Reduktion der Endoplasmatischen-Retikulum-Oxidase 1 (ERO 1) gekoppelt. [78]. Unter Verbrauch von Sauerstoff kann ERO 1 re-oxidiert werden, wobei H_2O_2 und damit reaktive oxidative Radikale gebildet werden (siehe Abbildung 3).

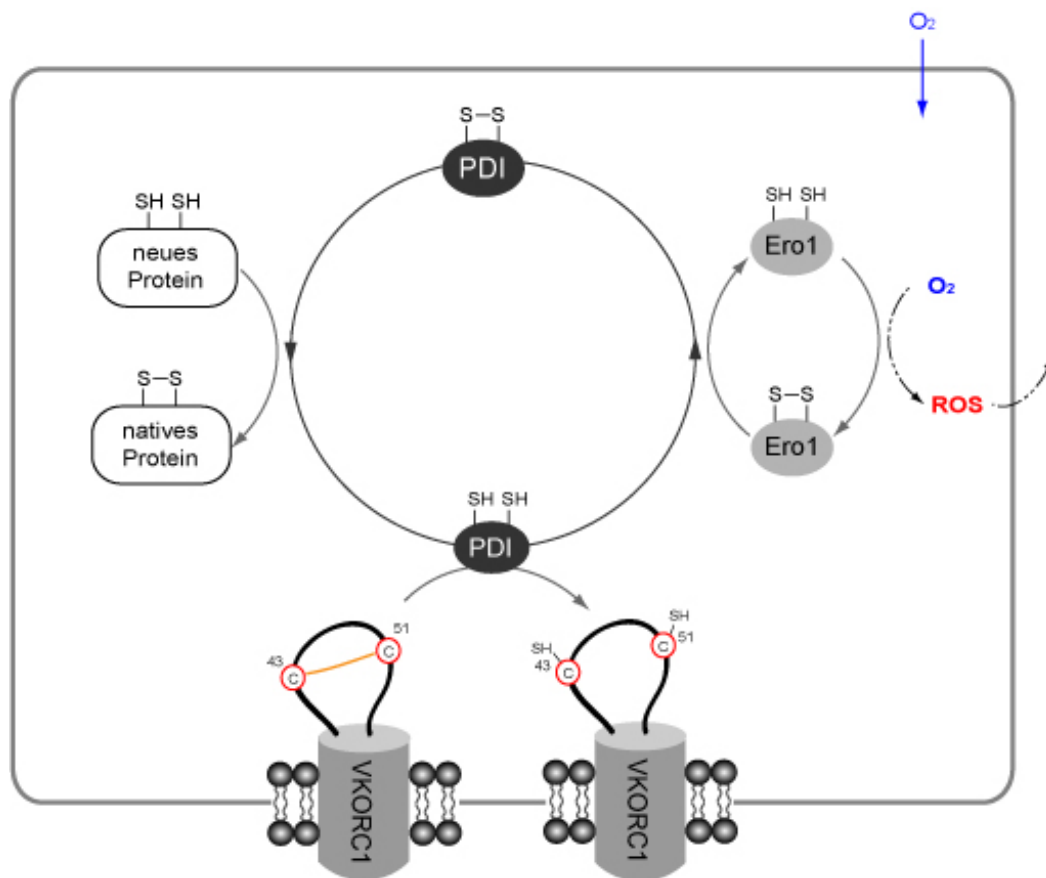


Abbildung 4: **Das Modell des VKOR-PDI-Redoxkomplexes**

Die PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) reduziert die Cysteine 43 und 51 im 1/2 –Segment der VKORC1, welche wiederum die Reduktionsäquivalente an das CXXC-Motiv überführen. Das CXXC-Motiv der Trx-like Domäne der PDI wird durch neu synthetisierte Proteine im ER-Lumen reduziert. ERO1 (Endoplasmatische-Retikulum-Oxidase 1) wiederum re-oxidiert PDI, wobei H₂O₂ als reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) entsteht, was oxidativen Stress zur Folge hat. (nach Wajih et al., 2007 und Chakravarthi et al., 2006).

1.2.2.1 VKORC₁

Das VKORC₁-Gen wurde 2004 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen auf dem kurzem Arm von Chromosom 16 identifiziert [15,16]. Die Funktion des VKORC₁-Proteins konnte durch den Nachweis von Mutationen bei Patienten mit erblich bedingtem Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren vom Typ 2 (VKCFD2), bei Patienten mit Warfarin-Resistenz sowie bei warfarinresistenten Ratten erbracht werden [79].

VKORC₁ stellt die zentrale Komponente der Reduktion zum Vitamin K Hydrochinon im Vitamin K-Zyklus dar [65], wobei vermutet wird, dass noch weitere Komponenten im Reduktase-System eine Rolle spielen [15,17,68,69].

Genomisch erstreckt sich das VKORC1-Gen über 5126 bp, wovon nur 492 bp den codierenden Bereich ausmachen. Dieser ist in 3 Exone unterteilt. Das VKORC1-Protein besteht aus 163 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von nur 18 kDa [15].

Die dreidimensionale Struktur des VKOR-Proteins von *Synechococcus sp.* wurde 2010 in den Arbeitsgruppen von Beckwith und Rapoport durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [80]. Durch Homologievergleiche des menschlichen VKORC1 mit dem des Bakteriums konnte ein Modell entwickelt werden, welches alle enzymatischen Funktionen erklärt. Das in Abbildung 5 gezeigte Modell zeigt beide Termini des Proteins ins Cytosol gerichtet, während alle enzymatisch wichtigen Reste ins ER-Lumen gerichtet sind. Die Schleife zwischen der Transmembran Domäne (TM) 1 und 2 ist die längste. Sie ist auf der periplasmatischen Seite lokalisiert und enthält alle enzymatisch wichtigen Aminosäuren. Diese 1/2-Schleife hat einen längeren N-terminalen Bereich, das 1/2-Segment, und eine kurze Helix, die 1/2-Helix. Im 1/2-Segment liegen zwei Cysteine an den Positionen 43 und 51. Die 1/2-Helix beginnt direkt nach dem Cystein51 und endet nach 5 Aminosäuren mit einem Serin. Strukturell bildet die Helix einen „Deckel“ des VKOR-Kanals [80].

Die Cysteine im 1/2-Segment überführen Reduktionsäquivalente von dem CXXC-Motiv einer Thioredoxin (Trx)-like Domäne, wie sie unter anderem die bereits beschriebene PDI besitzt, zu dem aktiven Zentrum, dem CXXC Motiv der VKOR. Dies geschieht, indem das CXXC-Motiv der Trx-like Domäne die Disulfid Brücke zwischen den Cysteinen43 und 51 in dem 1/2-Segment reduziert. Diese Cysteine reduzieren daraufhin das CXXC-Motiv der VKOR. Durch Reduktion des Chinons werden die Disulfide des CXXC-Motivs wieder erneuert. [80]

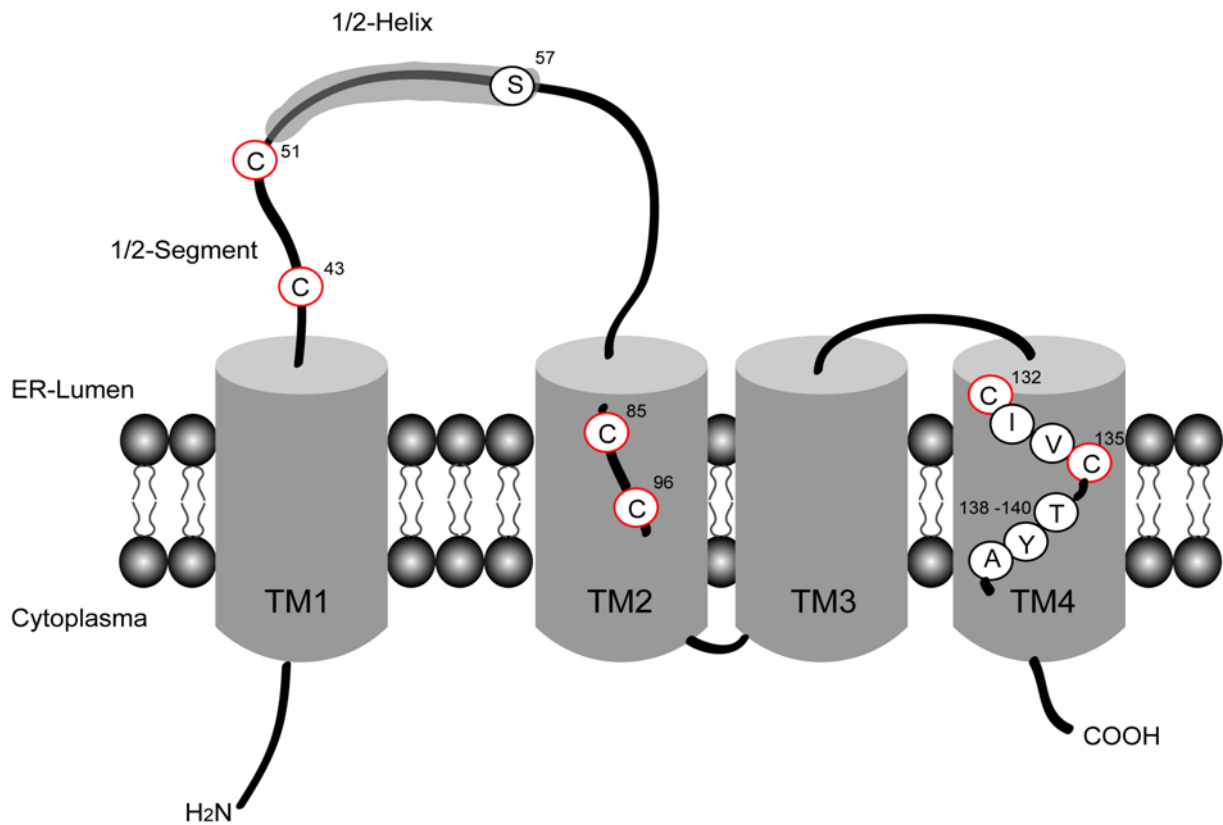


Abbildung 5: **Strukturmodell von VKORC1**

Das 163 Aminosäure kleine VKORC1-Protein ist mit 4 TM in der ER-Membran verankert. Bei dieser Struktur sind alle wichtigen Reste im ER-Lumen lokalisiert: das aktive Zentrum CXXC, wie auch das konservierte Serin57 in der 1/2-Helix sowie die beiden Cysteine im 1/2-Segment. Diese Topologie erlaubt den Transfer von Reduktionsäquivalenzen von einem Trx-like Redoxpartner über die VKOR auf das Chinon. Hierzu überträgt das Substrat Protonen auf die Cysteine43 und 51, wodurch sich die bestehende Disulfidbindung löst und eine Übertragung auf die Cysteine132 und 135 im aktiven Zentrum erfolgt. Das Motiv TYA in TM4 ist die vermutete Warfarin-Bindungsstelle. (Abbildung nach Li et al., 2010).

Von den 11 VKORC1-Mutationen, die beim Menschen zu partieller oder kompletter Resistenz gegenüber Coumarinen führen, liegen 8 in der Nähe der Chinon-Bindungsstelle. Darunter die Mutationen an den Stellen Val29, Arg33 und Asp36 in der 1. Transmembrandomäne, Arg58 und Trp59 direkt im Anschluss an die 1/2-Helix, Leu120 und Leu128 in der 3. Transmembrandomäne und Tyr139 in der 4. Transmembrandomäne an der postulierten Warfarin-Bindungsstelle [79,80].

Warfarin bindet an dieselbe oder benachbarte Stelle wie das Chinon, wobei die Tasche entweder für das Naphtochinon Vitamin K oder für Warfarin groß genug ist, nicht jedoch für beides gleichzeitig. Es wird angenommen, dass Warfarin Vitamin K aus der Bindungstasche verdrängt und damit die VKOR kompetitiv hemmt [80].

1.2.2.2 VKORC1L1

Durch Homologie-Studien wurde ein zu VKORC1 paraloges Gen gefunden, welches VKORC1L1 (Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1) genannt wurde (siehe Abbildung 6) [81]. Dieses Enzym weist *in vitro* ebenfalls eine VKOR-Aktivität auf, wobei die eigentliche Funktion und die natürlichen Substrate noch unklar sind. Mutationen, die die VKORC1-Aktivität auslöschen, führen zu einer erhöhten Blutungsneigung durch verminderte Carboxylierung der VKD-Proteine [15]. Dieser Enzymdefekt kann durch das intakte VKORC1L1-Protein *in vivo* offensichtlich nicht kompensiert werden. Ebenso kann bei den VKORC1-Knock-out-Mäusen VKORC1L1 die Blutungen nicht unterdrücken [73].

Homologiestudien zwischen Spezies zeigen, dass es sich bei VKORC1L1 um ein hoch konserviertes Protein handelt, was wiederum auf eine wichtige Funktion schließen lässt. Die VKORC1L1-Gene beim Menschen, Maus und Ratte zeigen eine Homologie von 97 %, während VKORC1 „nur“ eine Homologie von 79 bis 84 % unter Vertebraten besitzt. [82]

Das menschliche VKORC1L1-Gen ist auf Chromosom 7q11.21 lokalisiert. Es setzt sich aus 531 bp zusammen, die ebenfalls in 3 Exons geteilt sind. Das Protein besteht aus 176 Aminosäuren, die ein 19,8 kDa kleines Membranproteinen bilden.

VKORC1L1 besitzt, wie auch das VKORC1, ein hoch konserviertes CXXC- und ein TYX-Motiv (siehe Abbildung 6) und kann *in vitro* ebenfalls alleine die Reduktion von Vitamin K-Epoxid zum Hydrochinon katalysieren (siehe Abschnitt 3.1). Diese Reaktion ist ebenfalls Warfarin-sensitiv [83].

Bislang wurden allerdings im VKORC1L1-Gen noch keine Mutationen bei Menschen oder warfarinresistenten Ratten gefunden, so dass über die eigentliche Funktion noch nichts bekannt ist.

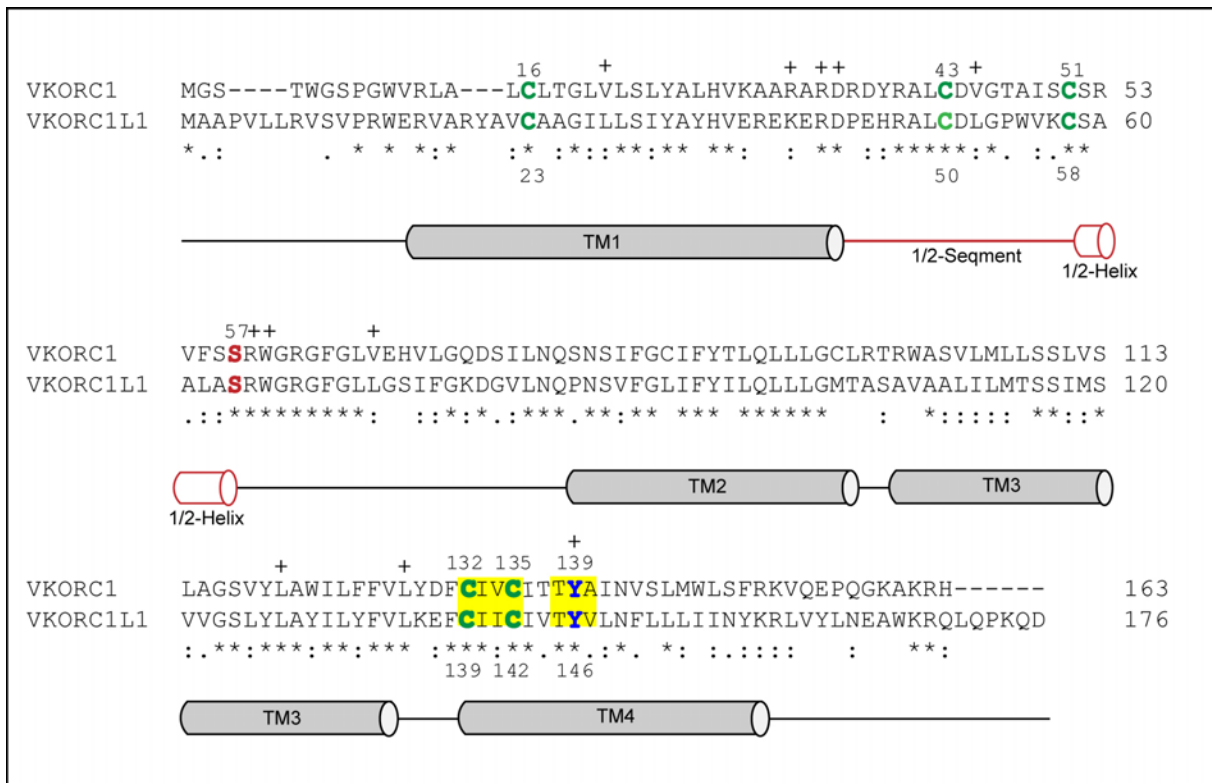


Abbildung 6: CLUSTAL W (2.0.12) multiple sequence alignment von VKORC1 und VKORC1L1.

Das Alignment der beiden paralogen VKOR-Proteine zeigte einen Score von 488. Die mit einem Stern markierten 75 Aminosäuren sind identisch (46,0 % von 163). Die 43 mit einem Doppelpunkt markierten Positionen bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (26,4 % von 163), während die 12 Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften mit einem Punkt markiert sind (7,4 % von 163). VKORC1L1 hat 13 zusätzliche Aminosäuren an den N- und C-Termini. Gelb unterlegt sind das CXXC-Motiv sowie die Warfarin-Bindungsstelle TYX. Die konservierten Cysteine sind grün markiert und das Serin an Position 57 rot. Die von Li et al. 2010 erarbeitete Transmembran-Struktur ist unter der Sequenz schematisch dargestellt. Das 1/2-Segment und die 1/2-Helix sind rot markiert. Aminosäuren, die bei Mutationen im VKORC1 eine Warfarin-Resistenz verursachen, sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

1.3 Die γ -Glutamyl-Carboxylase und die VKD-Proteine

Das 13 kb große γ - Glutamyl-Carboxylase-Gen [84] befindet sich auf den kurzen Arm von Chromosom 2 und ist in 15 Exons unterteilt [85]. Das codierte Protein, die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) ist ein 95 kDa großes Membranprotein, welches im rauhen Endoplasmatischen Reticulum und Golgi-Apparat lokalisiert ist [86-88]. 2007 wurde die Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [89]. GGCX ist ein Protein mit fünf Transmembrandomänen (siehe Abbildung 7).

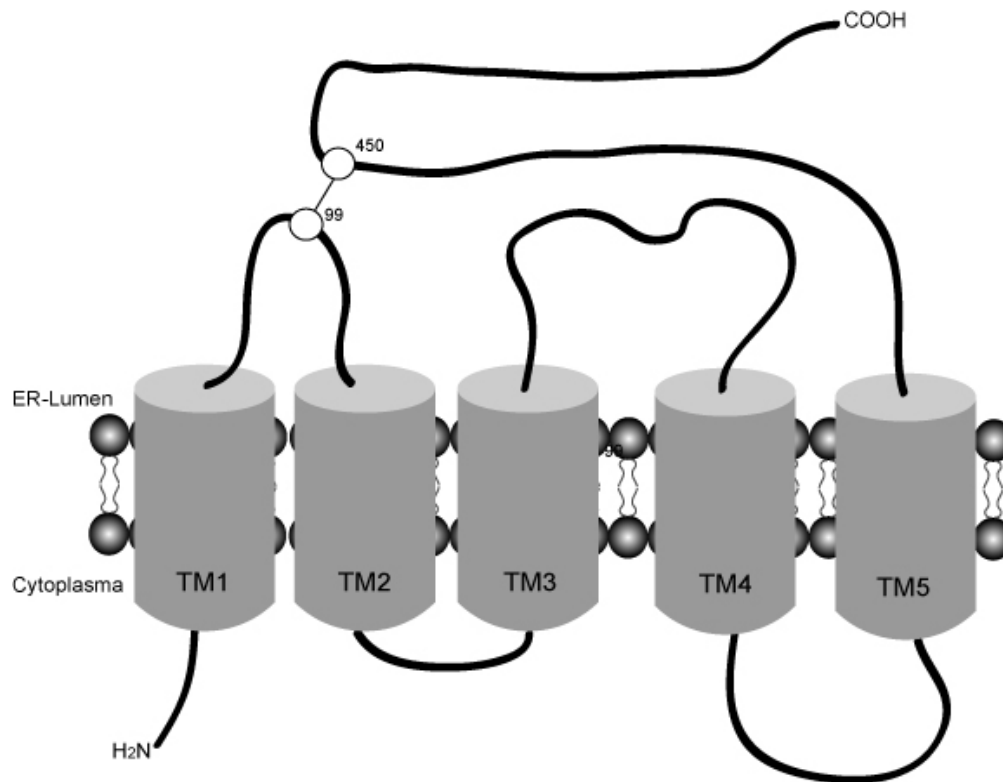


Abbildung 7: **Die Struktur der γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX)**

Die 5 Transmembrandomänen liegen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Das C-terminale Ende reicht in das Periplasma und bildet eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 450 und 99 in der ersten Schleife zwischen TM1 und TM2.

Die γ -Carboxylase wird vor allem in der Leber, Haut, Lunge und der Niere exprimiert [72]. In der Leber carboxyliert sie unter anderem Gerinnungsfaktoren, wobei für die Reaktion, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, Vitamin K-Hydrochinon als Cofaktor benötigt wird. Alle Vitamin-K-abhängigen Proteine (VKD-Proteine) enthalten eine hoch konservierte amino-terminale Gla-Domäne, die drei bis dreizehn Glutamatreste (Glu) beinhaltet [90-92]. Diese Gla-Domäne dient der GGCX als Substrat für die sequentielle Carboxylierung der Glutamatreste zu γ -Carboxyglutamatresten (Gla). Der Gla-Domäne ist eine hoch konservierte, 18 Aminosäuren lange Propeptidsequenz vorgelagert, welche als γ -Carboxylase-Erkennungsregion (γ -CRS, γ -carboxylase recognition site) bezeichnet wird [93]. Durch Mutationen dreier hochkonservierter Aminosäuren innerhalb der γ -CRS wird die Affinität des VKD-Proteins zur γ -Glutamyl-Carboxylase verringert [93] (siehe Abbildung 8).

Zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen zählen neben den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und den antikoagulatorischen Proteinen C und Z auch Proteine, die im Kalziumstoffwechsel bzw. noch weiteren physiologischen Prozessen eine Rolle spielen [45].

Fast alle VKD-Proteine besitzen zwei GF-(Growth factor) Domänen. Die Ausnahme ist das Prothrombin, welches stattdessen zwei Kringeldomänen aufweist. Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie das Protein C besitzen eine Serinprotease-(SP-) Domäne am C-Terminus, während Protein Z eine Pseudo-Serinprotease-Domäne ohne katalytische Aktivität aufweist. Protein S und das Gas 6-Protein (growth arrest specific protein 6) besitzen – anders als die bisher beschriebenen VKD-Proteine – vier GF-Domänen und zwei Steroidhormon-Bindungsdomänen (SHBD) [46,47,94,95].

Wie auch bei den Gerinnungsfaktoren ist die Fähigkeit, Kalzium-Ionen zu binden, bei den Proteinen Osteocalcin und dem Matrix-Gla Protein (MGP) essentiell [96][97]. Beide regulieren den Kalzium-Stoffwechsel, Osteocalcin hauptsächlich im Knochen und MGP in erster Linie in der extrazellulären Matrix von Lunge, Herz, Nieren, Knorpel und Arterien [98][99]. Dort verhindert es auf noch unbekannte Weise die Verkalkung von Knorpeln und Arterien [100].

Osteocalcin, welches auch als bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein bezeichnet wird, ist ein Peptidhormon, welches im Knochen von Osteoblasten synthetisiert wird [46,101,102]. Es bindet an Hydroxylapatit und Kalzium und lagert diese in den Knochen ein. Die Affinität zu beiden ist abhängig von der posttranslationalen Carboxylierung über die GGCX [103]. Bei zu geringem Level an carboxyliertem Osteocalcin kommt es zu einer Abschwächung der Knochendichte und dadurch zu einem erhöhten Fraktur-Risiko [51].

Unter den VKD-Proteinen sind auch die Wachstumsfaktoren Gas 6 und das Protein S, welche spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren [104] und darüber Apoptose, Zellwachstum und Zelltransformation beeinflussen [95][96]. Weitere Gla-Membranproteine sind die prolinreichen Gla-Proteine PRGP1 und PRGP2 sowie die Transmembranproteine TMG3 und TMG4, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist [105-107].

Da die Propeptidbindung eine entscheidende Rolle bei der γ -Carboxylierung zu spielen scheint, ist es interessant, dass eine Klasse von Gla-Proteinen ohne Propetidsequenz (GlaCrisp; Crisp= cystein-rich secretory protein) aus dem Gift der marinen Kegelschnecke *Conus marmoreus* ebenfalls von der GGCX erkannt wird [108]. Es gibt noch weitere Schnecken-Gift-Proteine, welche ebenfalls keine aminoterminalen Propetidsequenz haben. Diese nutzen stattdessen eine carboxyterminale Sequenz, die ein „neues“ GGCX Erkennungsmotiv darstellt [109]. Da

GlaCrisp-Proteine auch in Säugern vorkommen, könnten sie eine weitere Gruppe der Gla-Proteine bilden. [110]

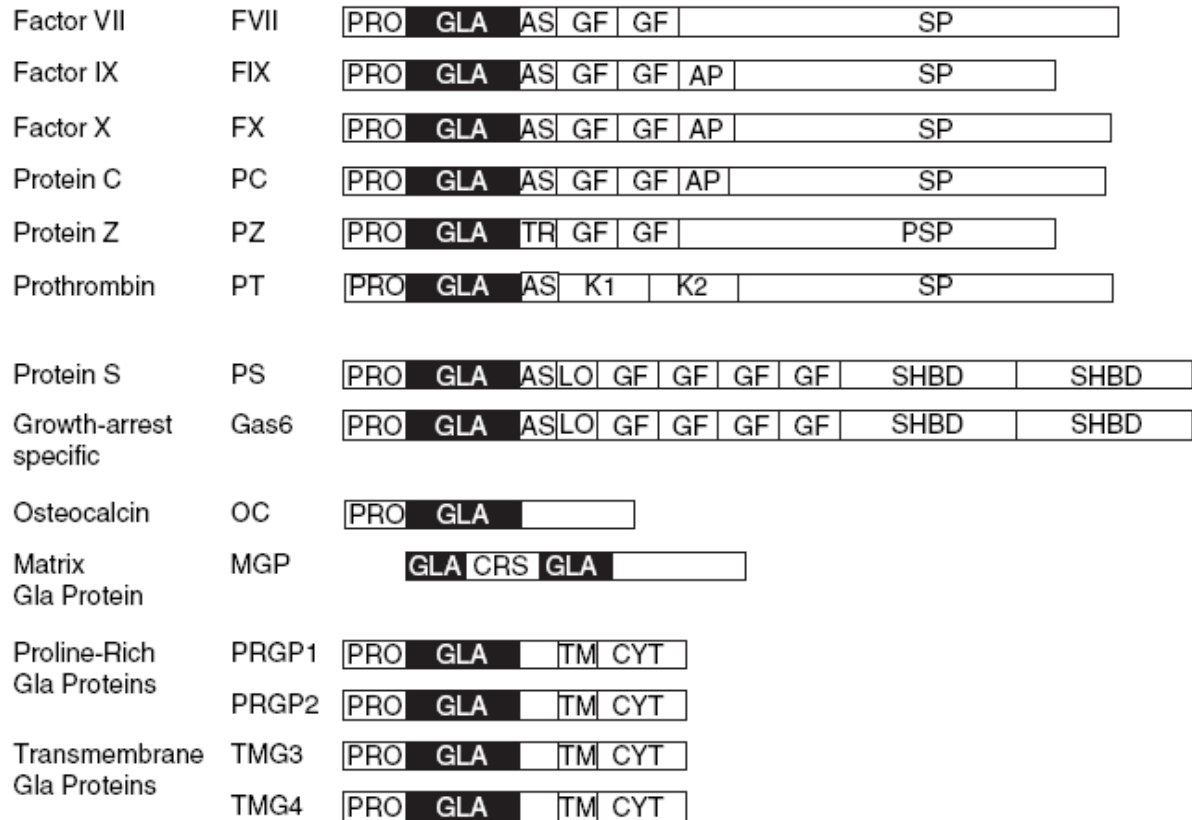


Abbildung 8: **Der schematische Aufbau der Vitamin K-abhängigen Proteine.**

PRO=Propeptid, GLA=Gla-Domäne, AS=kurze aromatische Sequenzen, GF=Wachstumsfaktor-ähnliche Domänen (Growth factor), SP=Serinprotease-Domäne, AP=Aktivierungspeptid, TR=Thrombin-sensitive Domäne, K=Kringle Domäne, PSP=Pseudo-Serinproteasedomäne, LO=Loop, SHBD=Steroidhormonbindestelle, CRS=Carboxylase Retention Signal, TM=Transmembrandomäne, CYT=Cytoplasmadomäne (nach Berkner und Runge, 2004).

Die Carboxylase nutzt die Oxidierung von Vitamin K-Hydrochinon für die Glu-Carboxylierung. Dadurch ist die Carboxylase beides, eine Epoxidase, welche Vitamin K-Hydrochinon zu Vitamin K-2,3-Epoxid oxidiert [103], wie auch eine Carboxylase, die Carboxyglutamat-Reste aus Glutamat-Resten generiert [111]. Durch die Carboxylierung wird aus dem schwachen Kalzium-Chelator Glutamat ein stärkerer Kalzium-Chelator, γ -Carboxyglutamat. Durch die stärkere Kalzium-Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, was zu einer Bindung der VKD-Proteine an Phospholipidmembranen führt [11]. An der Phospholipidmembranen gebunden, erfolgt eine Komplexbildung mit weiteren Aktivatoren und dadurch eine Aktivierung der VKD-Proteine.

Bei der Epoxidierung entsteht als Zwischenprodukt kurzweilig Vitamin K-Alkoxid, welches als starke Base dem γ -Kohlenstoff des Glutamatrestes ein Proton entzieht. Anschließend entsteht durch Anlagerung von Kohlenstoffdioxid das γ -Carboxyglutamat unter der Katalyse der GGCX [11,14]. Am Anfang dieser Reaktion steht das Lys218 der Carboxylase als schwache Base, welche die erste Deprotonisierung des Vitamin K-Hydrochinons katalysiert [112].

Durch eine verstärkte Expression von VKOR erhöht sich die Carboxylierung der VKD-Proteine durch die GGCX [113-115]. Auf der anderen Seite hat eine Verringerung der VKOR-Aktivität, z.B. durch Mutationen im VKORC1-Gen, eine mangelhafte Carboxylierung zur Folge [15]. Die VKOR-Aktivität scheint daher der limitierende Faktor der γ -Carboxylierung und damit der Blutgerinnung zu sein.

1.4 Vitamin K und die Blutgerinnung

Wie bereits beschrieben, gehören die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, sowie die gerinnungshemmenden Proteine C und S zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen. Ihre volle biochemische Aktivität erhalten sie durch die während der γ -Carboxylasereaktion gebildeten Carboxyglutamatreste, welche in Gegenwart von Kalziumionen an Phospholipidmembranen binden (vgl. Abschnitt 1.1). Dadurch hat Vitamin K eine wesentliche Funktion in der Regulierung der Blutgerinnung [60].

Hohe Dosierungen von Vitamin K (bis 40 mg tgl.) führen allerdings nicht zu pathologisch veränderten Gerinnungswerten (z.B. einer verstärkten Blutgerinnung und Thromboseneigung) [44]. Gerinnungsneigung und Fibrinolyse bleiben im Gleichgewicht. Gerinnungshemmende Wirkstoffe der Coumarin-Gruppe können allerdings durch vergleichsweise geringe Mengen Vitamin K (1 mg) in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden (siehe Abschnitt 1.4.1), weshalb bei Einnahme dieser Wirkstoffe keine übermäßige Aufnahme von Vitamin K erfolgen darf [44].

1.4.1 Coumarine inhibieren VKOR

3-3'-Methyl-bis-4-(hydroxycoumarin), auch Dicoumarol genannt, wurde 1940 von Stahmann et al. als ein natürlicher Antagonist von Vitamin K isoliert [2]. Entdeckt wurden die Substanz durch die „sweet clover disease“, einer Krankheit die in den 1920er Jahren bei Rindern auftrat, nachdem sie verdorbenen Klee gefressen hatten. Die Symptome waren lebensgefährliche

Blutungen, verursacht durch eine erniedrigte Prothrombinaktivität [2]. Die blutgerinnungshemmende Substanz wird von einem Schimmelpilz hergestellt und gehört zur Stoffgruppe der Coumarine.

Heutzutage werden zahlreiche 4-Hydroxycumarinderivate zur Antikoagulation (Blutgerinnungshemmung) verabreicht, darunter Warfarin (Coumadin[®]) und Phenprocoumon (Marcumar[®]). Diese Medikamente werden als Therapie oder zur Prophylaxe bei Erkrankungen oder Zuständen nötig, bei denen eine Neigung zur Bildung von Thromben vorliegt, um Thrombosen oder Embolien zu vermeiden [116]. Die Dosis muss bei jedem Patienten individuell eingestellt werden, da eine zu hohe Dosierung zu spontanen inneren Blutungen führen kann, während eine zu geringe Dosierung keine ausreichende antikoagulierende Wirkung hat und damit die Entstehung von Thromben nicht wirksam verhindert. Aufgrund dieser Eigenschaft wird hochdosiertes Warfarin seit den 1950er Jahren auch als Rodentizid verwendet, was zu einer gewissen Resistenz von Nagern gegenüber Warfarin geführt hat [117,118]. Diese Resistenz hat die Entwicklung potenterer Antikoagulantien der zweiten Generation notwendig gemacht [118-120]. Darunter fallen die Wirkstoffe Difenacoum, Bromadiolon, Brodifacoum und Flocoumafen (siehe Abbildung 9). Warfarin, das in den Vereinigten Staaten am häufigsten verabreichte Antikoagulant [121], besitzt zwei chirale Strukturen und wird als Racemat verwendet [122-124]. Mittlerweile wurde gezeigt, dass durch die Gabe von niedrig-dosiertem Vitamin K während einer Warfarin-Behandlung die Koagulanz stabilisiert werden kann [125,126].

Der Wirkmechanismus von Warfarin ist seit 1978 Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. So weiß man heute, dass oral verabreichtes Warfarin zum größten Teil an Plasmaproteine gebunden und im Körper über den Blutkreislauf transportiert wird. Daher erreicht nur ein kleiner Anteil an freiem Warfarin die Leber und kann dort als kompetitiver Inhibitor der VKOR wirken [127]. Durch diese Inhibierung wird die verfügbare Menge an reduziertem Vitamin K limitiert, welches als Cofaktor für die γ -Glutamylcarboxylase notwendig ist [128]. Die dadurch nicht oder nur teilweise carboxylierten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sind nur eingeschränkt aktiv, was wiederum die blutgerinnungshemmende Wirkung ausmacht [15,129]. Die Wirkung setzt allerdings erst nach etwa 48–72 Stunden ein, wenn die noch zirkulierenden Gerinnungsfaktoren verbraucht sind. Die Plasmahalbwertszeit von Warfarin beträgt circa 160 Stunden.

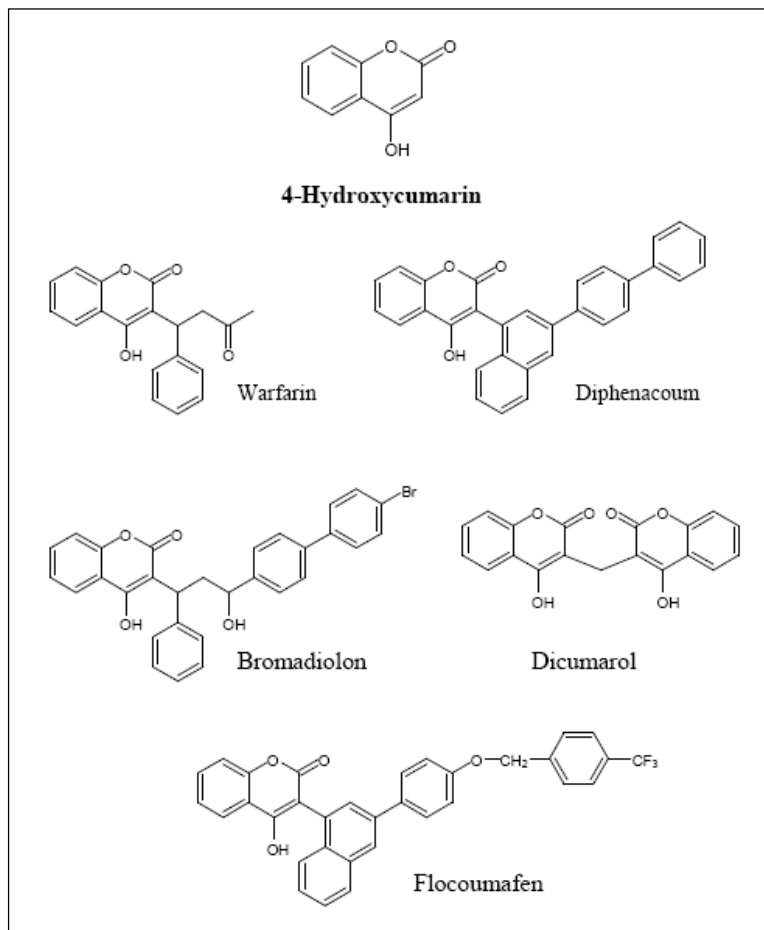


Abbildung 9: **4-Hydroxycoumarin** und seine **Derivate**.

Durch die Entdeckung des VKOR-Gens konnte zum Teil erklärt werden, warum manche Patienten unempfindlich gegenüber Coumarinderivaten sind und daher erheblich höhere Dosierungen benötigen. Standardmäßig werden für eine ausreichende Thromboseprophylaxe 2 bis 15 mg Marcumar pro Tag verabreicht. Patienten, bei denen eine sogenannte Warfarinresistenz vorliegt, benötigen 30 bis 150 mg Marcumar pro Tag. Die exogenen Faktoren, die die variierende Sensitivität gegenüber Warfarin erklären, können eine hohe Vitamin K-Aufnahme, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, welche die Warfarin-Halbwertszeit herabsetzen, oder eine verringerte Aufnahme im Darm sein [130,131].

Endogen gibt es eine autosomal dominant vererbare Warfarin-Unempfindlichkeit, welche durch eine veränderte Reaktion auf die Vitamin K-Antagonisten ausgelöst wird [132]. Die häufigste genetische Ursache sind jedoch Veränderungen im VKOR-Gen selbst [133]. Die im Abschnitt 1.2.2.1 aufgelisteten Mutationen bewirken eine unterschiedlich starke Marcumarresistenz. Die

großen individuellen Unterschiede in der Wirksamkeit der Coumarinderivate machen die Ermittlung einer effektiven Dosierung zu einem langwierigen Prozess. Ca. 25% diese Variabilität können auf Polymorphismen im Promotor des VKORC1-Gens zurückgeführt werden, die unterschiedliche Expressionsraten des Proteins zur Folge haben [123,134-138].

Da der Coumarin-Abbau abhängig von der hepatisch lokalisierten Hydroxylierung durch Proteine der P450-Familie ist, können Polymorphismen in diesen Genen ebenfalls die Warfarinsensitivität beeinflussen [139,140]. So können 10 % der Dosis-Variabilität durch Varianten im CYP2C9-Gen und 8 % durch Polymorphismen im CYP4F2-Gen erklärt werden [141]. Durch den dadurch verlangsamten Warfarinmetabolismus wird eine deutlich niedrigere Warfarindosis benötigt [134].

1.4.2 Calumenin - ein VKOR Regulator

Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) im Cytochrom P450- und VKORC1-Gen sind mit Warfarindosis-Effekten bereits assoziiert worden. Diese SNPs erklären allerdings nur 35 % der Warfarindosis-Unterschiede in der kaukasischen [137,142] und 10 % in der afro-amerikanischen Bevölkerung [143].

Wallin et al. identifizierten Calumenin und Cytochrom B5 als mögliche Inhibitoren der VKOR [144]. Sie konnten zeigen, dass die Produktion von funktionalem Vitamin K abhängigen Faktor IX *in vivo* um 80 % gesteigert werden konnte, wenn man die Expression von Calumenin mittels siRNA hemmte [113].

Calumenin gehört zu der kalziumbindenden, im ER lokalisierten CREC (Cab45/reticulocalbin/ERC45/calumenin)-Familie [145]. Mitglieder dieser Proteinfamilie haben ein EF-Hand Motiv und eine C-terminale Erkennungssequenz (HDEL, HDEF und HEEF) für ihren Transport in ER oder Golgi-Apparat [145]. Obwohl Calumenin ein hydrophiles, wasserlösliches Protein ist, kann es mit der ER-Membran assoziieren. So konnten Untersuchungen an Warfarin-resistenten Ratten und *in vitro* mRNA Silencing Calumenin als Warfarin-sensitiven VKOR-Regulator identifizieren [69,144,146].

2010 zeigte die Arbeitsgruppe um Voora, dass Träger einer Allelvariante im Calumenin-Gen (rs339097) eine höhere Warfarindosis benötigen. Diese seltene Allelvariante kommt in 11-14 % der afro-amerikanischen Bevölkerung vor, während nur 0,2 % der kaukasischen Bevölkerung

diesen Genotyp zeigen [147]. Zusätzlich wurden Variationen im GGCX-Gen ebenfalls mit der benötigten Warfarin-Dosis in Verbindung gebracht [148].

1.4.3 Vitamin K-abhängige klinische Phänotypen

Man unterscheidet zwischen erblich bedingten Vitamin K-abhängigen Phänotypen, bei denen eine Mutation in einem Gen des Vitamin-K-Zyklus vorliegt und erworbenen Vitamin K-abhängigen Phänotypen, bei denen durch Ernährung oder Medikamente die Menge an funktionalem Vitamin K beeinträchtigt ist. Ein Vitamin K-Mangel führt dabei immer zu einer reduzierten Carboxylierung der VKD-Proteine [149-151].

1.4.4 Erblich bedingter Mangel an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Eine Defizienz aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ist sehr selten. Dieses Krankheitsbild (VKCFD = combined deficiency of Vitamin K dependent clotting factors) wird autosomal rezessiv vererbt und entweder durch Mutationen im GGCX-Gen (VKCFD1) [152] oder durch Mutationen im VKORC1-Gen (VKCFD2) [153] verursacht. Das Krankheitsbild variiert, je nachdem wie viel funktionsfähige Blutgerinnungsfaktoren noch vorhanden sind. So kann es zu unterschiedlich stark auftretenden Blutungen und vereinzelt auch zu Skelettanomalien kommen [154].

Bei beiden Formen handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung: So sind nur 10 Patienten mit einer VKCFD1 bekannt, welche sehr unterschiedliche Ausprägung der Krankheit zeigen [81,155-158]. Der Blutungsphänotyp wird meist erfolgreich durch Vitamin K-Substitution behandelt, wobei die Ansprache von VKCFD1-Patienten bei der Gabe von bis zu 10 mg Vitamin K täglich sehr unterschiedlich ausfällt [159].

Die drei publizierten Patienten mit VKCFD2 zeigten eine identische Mutation im VKORC1-Gen, wobei hier eine geringe Vitamin K-Substitution (5-10 mg wöchentlich) zur Behandlung ausreichte [15,160]. Im VKORC1-Gen sind weiterhin Polymorphismen und Haplotypen bekannt, die Auswirkungen auf die benötigte Warfarin-Dosis haben [135,161,162]. Ein SNP (Single Nucleotide Polymorphism) im VKORC1-Lokus ist in einer chinesischen Kohorte z.B. mit schwach-carboxylierten Osteocalcin- und schwach-carboxylierten Prothrombin-Konzentrationen

(=PIVKA-II) assoziiert worden [163]. Die benötigte Vitamin K-Dosis ist jedoch meist individuell sehr verschieden [164].

Der Unterschied von VKCFD1 und 2 ist durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen von GGCX und VKORC1 zu erklären. So ist bei den bekannten Mutationen im GGCX-Gen entweder die Propeptidbindungsstelle für die Vitamin K-abhängigen (VKD-) Proteine [81,165,166] oder die Vitamin-K-Hydrochinon-Bindestelle beeinträchtigt [167]. Im ersten Fall sinkt die Affinität der VKD-Proteine zur Carboxylase, während im zweiten Fall die Aktivität der Carboxylase an sich abnimmt. Mutationen im VKORC1-Gen zeigen einen anderen Pathomechanismus. Hierbei steht nicht mehr genug Vitamin K-Hydrochinon als essentieller Cofaktor der GGCX zu Verfügung [168].

1.4.5 Erworbene Vitamin-K-Defizienz

Weitaus häufiger als der genetisch verursachte VKCFD-Phänotyp ist eine erworbene Vitamin K-Defizienz, meist allerdings ohne schwere klinische Konsequenzen.

Eine unzureichende Ernährung, in der Regel bedingt durch eine gestörte Nahrungsaufnahme, gehört zu den Hauptursachen [169]. So haben Neugeborene, bei denen während der Schwangerschaft ein Vitamin-K Mangel vorlag, innerhalb der ersten Lebensmonate ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende Blutungen (engl. Vitamin K deficiency bleeding; VKDB) [170]. Bei starkem Vitamin K-Mangel während der Schwangerschaft kann beim Feten ein Phänotyp auftreten, welcher einer warfarininduzierten Embryopathie gleicht (vgl. Abschnitt 1.5) [46,171,172]. Bei Erwachsenen kommt es durch einen ernährungsbedingten Vitamin K-Mangel selten zu solch heftigen Störungen. Allerdings liefert eine Vitamin K-Unterversorgung einen Beitrag zu verschiedenen chronischen Erkrankungen, die durch gestörte Kalzifizierung gekennzeichnet sind, wie Osteoporose [173], Gefäßverkalkung [174] und Arthrose [175]. Dies ist durch die verminderte Aktivität der VKD-Proteine erklärbar [42].

1.5 Warfarin Embryopathie und Chondrodysplasia punctata

Eine Warfarin-Embryopathie oder auch Warfarin-Syndrom, tritt bei Kindern auf, deren Müttern vor allem im Zeitraum der 6. - 12. Schwangerschaftswoche Antikoagulationsmittel wie Warfarin verabreicht wurden [176,177]. Ein ernährungsbedingter Vitamin K-Mangel während der Schwangerschaft löst ebenfalls eine Embryopathie aus [172,177].

Bedingt durch die verminderte Carboxylierung von Osteocalcin und MGP werden knorpelige Strukturen des Embryos kalzifiziert, während Knochen nicht ausreichend mineralisiert werden. Der Phänotyp ist durch eine Mittelgesichts- und besonders Nasenhypoplasie bedingt durch die fehlerhafte Kalzifizierung charakterisiert [178-180]. Dieser ähnelt dem Keutel-Syndrom und der Chondrodysplasia punctata. Der einzige Unterschied zu Chondrodysplasia punctata scheint das Fehlen von Haar- und Hautveränderungen zu sein [181].

Die Chondrodysplasia punctata [182], eine Gruppe erblicher Krankheiten, zeigt ebenfalls punktförmige Kalzifizierung von Knorpelgewebe an Gelenkknorpeln, Kehlkopf (Larynx) und Luftröhre (Trachea). Weitere Symptome sind dysproportionierter Minderwuchs mit verkürzten Extremitäten, Verhornungsstörung und dadurch Hautläsionen, grauer Star und Dysmorphien (hypoplastische Nasenwurzel) [171,177]. Die Warfarin-Embryopathie gilt daher als Phänokopie dieser Erkrankung [176,182].

Zu dieser Gruppe gehört die X-chromosomal dominante Chondrodysplasia punctata, welche auch als Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom bezeichnet wird [183]. Sie ist durch eine lamelläre ichthyosiforme Erythrodermie, evtl. nur einseitige Katarakte und asymmetrische Gliedmaßenverkürzungen gekennzeichnet. Zusätzlich werden auch Herzfehler beschrieben. Die Intelligenz ist normal. Es sind fast ausschließlich Frauen betroffen, da Hemizygote i.d.R. nicht lebensfähig sind [184]. Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen im „Emopamil-binding-protein“ (EBP)-Gen [185]. Die meisten beschriebenen Mutationen führen zu einem verkürzten und somit inaktiven Protein, welches auch Auswirkungen auf die Cholesterol-Biosynthese hat [186]. Das Emopamil-binding Protein (EBP) bindet an Emopamil ((2s)-2-isopropyl-5-methylphenethylamino-2-phenylvaleronitril hydrochloride) und gehört zu der Familie der sogenannten Sigma-Rezeptoren. Sigma-Rezeptoren interagieren mit Kalzium-Kanälen [186], weshalb Emopamil auch als Kalzium-Antagonist bei Herzrhythmusstörungen verabreicht wird [187].

Weitere Formen der Chondrodysplasia punctata sind der X-chromosomal rezessive Typ 1 (CDPX1) der durch einen Defekt im Arylsulfatase E (ARSE)-Gen verursacht wird [188]. Daneben gibt es zwei autosomale Formen der Chondrodysplasia punctata. Der autosomale rhizomele Typ 1 (RCDP 1) [189], welcher durch Mutationen im Gen für das peroxisomale Transportprotein Peroxin-7 (PEX7) auf Chromosom 6 verursacht wird und der autosomale rhizomele Typ 2 (RCDP 2) [190], verursacht durch eine Defizienz der Acyl-CoA:Dihydroxyacetonephosphate Acyltransferase (DHAPAT).

Weiter zu nennen sind die Brachytelephalange Chondrodysplasia Punctata (BCDP) [191] und die Chondrodysplasia Punctata vom Tibia-Metacarpal Typ [192]. Die verschiedenen Formen werden fast alle mit einem Vitamin K Mangel bzw. mit Warfarin-Teratogenität in Verbindung gebracht [176].

1.6 VKOR Interaktionen

Die Vermutung, dass VKORC1 einen Komplex mit anderen, noch unbekanntem Proteinen bildet, wird seit längerer Zeit diskutiert (vgl. Kap. 1.2.2). Seit der Entdeckung des VKORC1-Gens im Jahre 2004 wird der Mechanismus der VKOR verstärkt von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So konnte bereits gezeigt werden, dass VKORC1 mit der Protein Disulfid Isomerase (PDI) interagiert [75]. Das bestätigt die Vermutung, dass das Thioredoxin-ähnliche CXXC-Zentrum der VKOR bei der Elektronenübertragung eine Rolle spielt [75,80]. Solche Erkenntnisse sind wichtig für das Verständnis des Reduktionsmechanismus und helfen unter anderem die Wirkung von Medikamenten, die in den Vitamin K Zyklus eingreifen, besser zu verstehen. Neben der PDI wurden auch Calumenin als möglicher VKOR-Interaktionspartner identifiziert. Die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) muss als Abnehmer des VKOR-Produkts, Vitamin KH_2 , ebenfalls direkt mit der VKOR interagieren, wobei der Mechanismus im Einzelnen nicht bekannt ist [107,193,194].

Interaktionsstudien intakter Membranproteine in ihrem zellulären Raum gestalten sich aber als schwierig, da die Lokalisation in einer Membran die Proteine vor den meisten proteinchemischen Manipulationen erfolgreich abschirmt.

Um potenzielle Interaktionspartner von VKOR möglichst „hypothesen-frei“ zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren angewendet, welches die Möglichkeit gibt, Membranproteine gegen eine cDNA-Bank auf Interaktionspartner zu untersuchen. Dieses „Split-Ubiquitin“-Verfahren beruht auf der Entwicklung neuer Sensorproteine und macht sich die Ergebnisse des Humangenom-Projekts bei der Entschlüsselung der menschlichen Gene zunutze.

Das klassische Two-Hybrid System, auf dem die hier verwendete Screening Methode basiert, ist ausschließlich für Hybridproteine geeignet, die in den Kern importiert werden können und daher leider nicht für Membranproteine [195]. Das grundlegende Prinzip ist allerdings dasselbe. Zwei zu untersuchende Proteine werden mit unterschiedlichen Polypeptiden (Sensorpeptide)

verlängert. Diese beiden Sensorpeptide führen zusammen eine messbare Reaktion aus, deren Effizienz von der Distanz, die zwischen den beiden Sensoren liegt, unmittelbar abhängt. Da diese Distanz von den Interaktionen der an die Sensorpeptide gekoppelten Proteine gesteuert wird, lassen sich so Aussagen über die Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen treffen.

1.6.1 Das Split-Ubiquitin-System

Das hier verwendete Split-Ubiquitin-System ist eine Weiterentwicklung des klassischen Two-Hybrid-System. Es wurde 1994 von Johnsson and Varshavsky als ein typisches Zwei-Komponenten-System mit einem Split-Protein-Sensor (USPS) entwickelt, welches zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* genutzt werden kann [196].

Bei einem zwei Komponenten System tragen zwei potentielle Interaktionspartner („Köder“ und „Beute“) jeweils eine Komponente eines Reportersystems. Erst durch Zusammenlagerung von Köder und Beute zu einem Komplex kommt es auch zu einer Verbindung beider Reporter-Komponenten und dadurch zu einer Aktivierung des Reporters.

Bei dem klassischen Two-Hybrid-System werden an Köder und Beute eine DNA-Bindedomäne bzw. eine Aktivatoromäne gekoppelt. Durch die Bildung eines Interaktionskomplexes entsteht so ein DNA-Aktivierungsprotein [197]. Da sich der Interaktions-Komplex so verhalten muss wie das Reporterprotein, scheiden alle Proteine als Beute aus, die nicht in den Kern transportiert werden können. Dieses Problem wird bei dem in dieser Arbeit verwendeten Split-Ubiquitin-System dadurch gelöst, dass nicht der Interaktions-Komplex selbst als Reporter dient, sondern ein weiterer Reporter bei Interaktion freigesetzt wird, welcher räumlich unabhängig von den interagierenden Proteinen aktiv werden kann. So ermöglicht es diese Methode, Interaktionen zwischen Membranproteinen, wie der VKOR, in lebenden Zellen an den Orten zu untersuchen, an denen die Interaktion in der Zelle stattfindet [198,199].

Dieses System basiert auf den Eigenschaften von Ubiquitin, einem 8,5 kDa kleinen, hoch konservierten Protein, welches andere Proteine für den Abbau markiert. Die abzubauenen Proteine werden an ein C-terminales Gly-Gly-Segment von Ubiquitin gekoppelt, welches dann wiederum von einer spezifischen Ubiquitin Protease (UBPs) erkannt und abgespalten wird. Hinzu kommt, dass Ubiquitin auf Strukturebene in zwei Hälften, den N-terminalen Nub (Reste 1-35) und den C-terminalen Cub (Reste 36-76) geteilt werden kann. Diese Hälften müssen nicht

über eine Peptidbindung verbunden sein, so dass sie auch getrennt voneinander exprimiert werden können. Beide Hälften haben eine sehr hohe Affinität zur Reassoziaton und lagern sich spontan zu einem funktionellen Ubiquitin-Molekül (Split-Ubiquitin) zusammen, welches daraufhin von der UBP im Zytoplasma spezifisch geschnitten wird [196].

Durch Austausch der Aminosäure Isoleucin an Position 13 des Nub-Fragmentes wird dessen Faltung destabilisiert (Ile13 → Gly, NubI → NubG). Dies führt zu einer deutlich geringeren Affinität zur Reassoziaton von NubG und Cub [196,200]. Koexprimiert man die C-terminale Hälfte des Ubiquitins als Fusionsprotein mit einem Reporterprotein (Cub-R) und einer Nub-Mutanten (NubG), reassoziieren die Fragmente nicht und die Ubiquitin-spezifische Protease kann das Reporterprotein nicht mehr abschneiden.

Durch „gewaltsames“ Zusammenführen der beiden Hälften, im Sinne eines *induced fit*, können sich die beiden Polypeptidfragmente so sehr annähern, dass aktives Ubiquitin gebildet wird, welches wiederum von der Protease erkannt wird. Diese Tatsache macht sich das so genannte Split-Ubiquitin-System zu nutzen [196,198,199,201].

Bei dem Split-Ubiquitin System koppelt man nun je ein Protein an Cub und an eine solche Nub-Mutante und koexprimiert diese. Bei Interaktion der beiden Proteine wird die lokale Konzentration der Ubiquitin-Peptide so stark erhöht, dass die Reassoziaton zum Ubiquitin trotz Nub-Mutation zustande kommt und der Reporter effizient vom Cub abgespalten wird (siehe Abbildung 10).

Hierbei ist die zelluläre Lokalisation der beiden möglichen Interaktionspartner nebensächlich. Wichtig ist nur, dass das Reporterprotein ins Zytoplasma gerichtet ist, so dass die Protease spalten kann.

In dieser Arbeit wurden die VKOR-Paralogen VKORC1 und VKORC1L, wie auch die γ -Glutamyl-Carboxylase als „Köder“ mit dem Cub-Fragment und einem artifiziellen Transkriptionsfaktor (LexA-VP16) fusioniert. Dieser besteht aus einer bakteriellen LexA DNA-bindenden Domäne und der Herpes Simplex VP16 transaktivierenden Domäne. Als „Beute“ wurde eine cDNA-Klonbank mit dem NubG-Fragment fusioniert. Wenn bei Koexpression eine Interaktion zwischen Köder und Beute stattfindet und die Fragmente sich dadurch in räumlicher Nähe befinden, assoziieren beide Ubiquitin-Fragmente und der Transkriptionsfaktor wird abgespalten. Der freigesetzte Transkriptionsfaktor diffundiert daraufhin in den Nukleus und

aktiviert dort die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*. Der Interaktionsnachweis wird mit Hilfe der auxotrophen Marker *HIS3* und *ADE2* möglich, da nur die positiven Klone von *Saccharomyces cerevisiae* auf dem entsprechenden Selektionsmedium wachsen können. Zusätzlich wird durch die *lacZ*-Gen-kodierte β -Galaktosidase ein kolorimetrischer Nachweis der Protein-Interaktion möglich. Diese Reporterogenaktivität kann gemessen werden und dient als Maß der Proteininteraktion.

Durch das Einsetzen einer NubG-fusionierten cDNA-Klonbank kann man den gewünschten „Köder“ gegen eine große Anzahl von Kandidaten screenen. Die hierfür verwendete RNA wird eingekauft bzw. aus ganzem Gewebe/Organen isoliert.

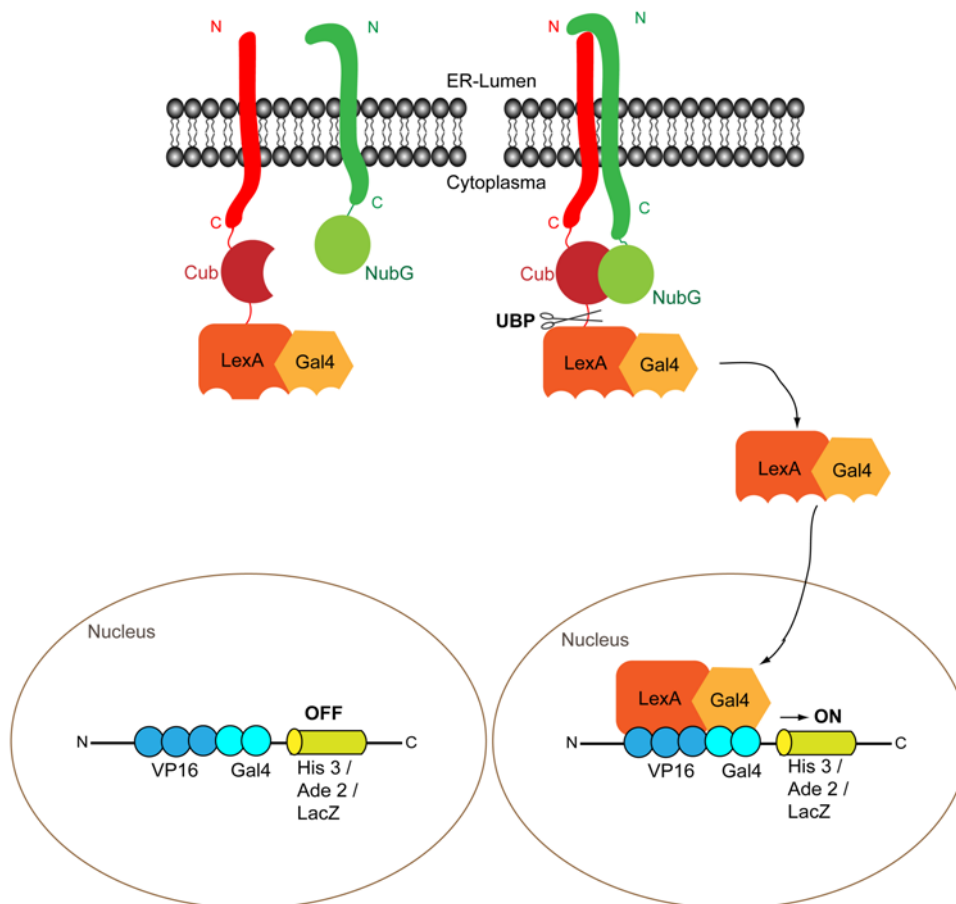


Abbildung 10: **Das Split-Ubiquitin Prinzip.**

Der „Köder“ wird an die C-terminale Hälfte von Ubiquitin (Cub) fusioniert, während die cDNA-Klone („Beute“) an die mutierte N-terminale Hälfte (NubG) fusioniert sind. Ohne Proteininteraktion können sich Cub und NubG nicht zu Split-Ubiquitin zusammenlagern und die Reporterproteine können nicht abgespalten werden. Bei Proteininteraktion kommt es zu einer Assoziation von Cub und NubG und dadurch zu aktiven Split-Ubiquitin. Die Ubiquitin-spezifische Protease (UBP) schneidet C-terminal von Cub und setzt so den Transkriptionsfaktor frei. Im Nucleus aktiviert dieser die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Seit langem wurde vermutet, dass es sich bei den Proteinen des Vitamin K-Zyklus (der „Vitamin K-Epoxid-Reduktase-Reaktion“, VKOR) um einen Komplex von mehreren Proteinen handelt. Nach der Entdeckung des VKORC1-Gens im Jahre 2004 durch Darrel Stafford's und unsere Arbeitsgruppe sind keine weiteren beteiligten Proteine identifiziert worden. Erst Mitte 2010 konnte gezeigt werden, dass die zur Reduktion von Vitamin K-2,3-Epoxid erforderlichen Elektronen bei einem homologen VKOR-Protein aus Bakterien von „thioredoxin (Trx)-like“ Proteinen, PDIA16 und TMX bereit gestellt werden [74]. Weitere vermutete Interaktionen z.B. die Interaktion mit der γ -Glutamyl-Transferase (GGCX), aber auch der Mechanismus der Hemmung durch Warfarin sind noch nicht völlig verstanden.

Zunächst sollten deshalb die enzym-kinetischen Eigenschaften der paralogen Proteins VKORC1-like1 (VKORC1L1) untersucht werden, dessen Gen bereits zusammen mit VKORC1 identifiziert worden war, dessen Funktion aber noch völlig unbekannt war. Ergänzend dazu sollten in diesem Protein mittels Mutagenese einzelne Aminosäuren, die in VKORC1 kritische Funktionen ausführen, systematisch ausgetauscht werden, um den Effekt auf die enzymatische Aktivität zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten in diesem Zusammenhang mögliche Interaktionspartner der VKORC1, sowie des paralogen Proteins VKORC1L1 gesucht werden. Grundlage hierzu bildete das Split-Ubiquitin-System und dessen Möglichkeit, auch für membranständige Proteine Interaktionspartner *in vivo* in einem cDNA-Datenbank Screen zu finden [196].

Einige der hierbei gefundenen Kandidaten sollten anschließend mittels Ko-Immunpräzipitation unabhängig auf ihre Interaktion überprüft werden. Durch Ko-Immun-Fluoreszenz sollte die subzelluläre Lokalisation ermittelt werden.

Die dadurch neu gewonnenen Erkenntnisse sollen einen weiteren Beitrag zum Verständnis des Vitamin K Zyklus liefern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen in höchster Reinheitsstufe bezogen: PEQLAB Biotechnologie GmbH, Amersham, AppliCem, BioRad, Braun, Cell Signaling, Fluka, Gibco-BRL, Invitrogen, Merck, New England BioLabs, Pharmacia, Carl Roth, Serva, Sigma-Aldrich Chemie, Stratagene, Roche Applied Science

2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma METABION synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in TE- Puffer gelöst, so dass eine Endkonzentration von 100 pmol/ µl erreicht wurde.

Bezeichnung	Sequenz: 5' - 3'
pcDNA3.1_FGG-Myc-His_B_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGAGTTGGTCCTTGCACCC
pcDNA3.1_FGG-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCAACGTCTCCAGCCTGTTTGG
pcDNA3.1_PDIA6-Myc-His_B_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGCTCTCCTGGTGCTCGG
pcDNA3.1_PDIA6-Myc-His_B_NotI_R	CGCGCGGCCGCCCCAACTCATCTTTCCTAA
pcDNA3.1_CD63-Myc-His_B_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGCGGTGGAAGGAGGAAT
pcDNA3.1_CD63-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCCATCACCTCGTAGCCACTTC
pcDNA3.1_EBP-Myc-His_B_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGACTACCAACGCGGGCCC
pcDNA3.1_EBP-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCGTTCTTCTTGCTCTTGGCTT

pcDNA3.1_SERP1-Myc-His_B_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGTCGCCAAGCAAAGGAT
pcDNA3.1_SERP1-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCCATGCCCATCCTGATACTTT
pcDNA3.1_VKORC1_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGGCAGCACCTGGGGGAG
pcDNA3.1_VKORC1_Flag_EcoRI_R	CGCGAATTCTCACTTGTTCATCGTTCGTCCTTGTAGTCTCCG TGCCTCTTAGCCTTGCCCTG
pcDNA3.1_VKORC1-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCTCCGTGCCTCTTAGCCTTGCCCTG
pcDNA3.1_Flag_VKORC1_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAA GATGGGCAGCACCTGGGGGAG
pcDNA3.1_Flag_VKORC1_EcoRI_R	CGCGAATTCTCAGTGCCTCTTAGCCTTGC
pcDNA3.1_VKORC1L1_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGCGGCTCCCGTCCTGCT
pcDNA3.1_VKORC1L1_Flag_EcoRI_R	CGCGAATTCTCACTTGTTCATCGTTCGTCCTTGTAGTCTCCG TCTTGCCTTGGGTTGCAGCT
pcDNA3.1_VKORC1L1-Myc-His_B_EcoRI_R	CGCGAATTCCCTCCGTCCCTGCTTGGGTTGCAGCT
pcDNA3.1_Flag_VKORC1L1_HindIII_F	GCGAAGCTTACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAA GATGGCGGCTCCCGTCCTGCT
pcDNA3.1_Flag_VKORC1L1_EcoRI_R	GCGAATTCTCAGTCCCTGCTTGGGTTGCA
pBT3-STE_VKORC1L1_Sfi1_F	AATGGCCATTACGGCCATGGCGGCTCCCGTCCTGCT
pBT3-STE_VKORC1L1_Sfi1_R	GATGGCCGAGGCGGCCAGTCCTGCTTGGGTTGCAGCT G
pBT3-STE_VKORC1_Sfi1_F	AATGGCCATTACGGCCATGGGCAGCACCTGGGGGAG
pBT3-STE_VKORC1_Sfi1_R	GATGGCCGAGGCGGCCCTTGTGCCTCTTAGCCTTGCCCTG
pBT3-STE_GGCX_Sfi1_F	GTAATGGCCATTACGGCCATGGCGGTGTCTGCCGGGTC
pBT3-STE_GGCX_Sfi1_R	GCAGATGGCCGAGGCGGCCCTTGAACCTCTGAGTGGACAG GATC
pBT3-N_GGCX_Sfi1_F	CTGCAGGGCCATTACGGCCATGGCGGTGTCTGCCGGGT C
pBT3-N_GGCX_Sfi1_R	CCATGGGGCCGAGGCGGCCCTCAGAACTCTGAGTGGACA G
pCEP4-VKORC111_BamHI_F	AGCGGATCCATGGCGGCTCCCGTCCTGCTAAG
pCEP4-VKORC111_EcoRI_R	CGGGAAATTCGTCCTGCTTGGGTTGCAGC

Tabelle 1: **Klonierungsprimer**

Die Annealingtemperatur betrug standardmäßig 60°C.

Bezeichnung	Sequenz: 5' - 3'
VKORC1-intern-F	GTCTGATGCTGCTGAGCTCC
VKORC1L1-intern-F	GCCTACATCTGTACTTTGTGC
pCEP F	AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
pCEP R	TGTGGTTTGTCCAAACTCATC
M13 F	TGTA AAAACGACGGCCAGT
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC
pcDNA3.1_F	TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNA3.1_R	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
pBT3-STE-F	CACACACTAATCTAG
pBT3-STE-R	TGTIGATCTGGAGGG
pBR3-N-F	GTCGAAAATTCAAGACAAGG
pBR3-N-R	AAGCGTGACATAACTAATTAC
pBT3-N-F	GTAAGGTGGACTCCTTCT
pBT3-N-R	AAGCGTGACATAACTAATTAC

Tabelle 2: Sequenzierprimer

Die Annealingtemperatur betrug standardmäßig 55°C.

Bezeichnung	Sequenz: 5' - 3'
VKORC1L1_C23S_F	TGGCCCGGTATGCAGTGTCCGCTGCCGGAATCCT
VKORC1L1_C23S_R	AGGATTCGGCAGCGGACACTGCATACCGGGCCA
VKORC1L1_C50S_F	AGCACCGGGCCCTCTCCGACCTGGGGCCCTG
VKORC1L1_C50S_R	CAGGGCCCCAGGTCGGAGAGGGCCCCGGTGCT
VKORC1L1_C58S_F	GCCCTGGGTGAAGTCCTCCGCCGCCCTTGCCTCCAG
VKORC1L1_C58S_R	CTGGAGGCAAGGGCGGCGGAGGACTTCACCCAGGGC
VKORC1L1_C139S_F	TGCTGAAGGAGTTCTCCATCATCTGCATCGTCAC
VKORC1L1_C139S_R	GTGACGATGCAGATGATGGAGAACTCCTTCAGCA
VKORC1L1_C142S_F	GTCTGCATCATCTCCATCGTCACGTACGTGCTG
VKORC1L1_C142S_R	CAGCACGTACGTGACGATGGAGATGATGCAGAAC

Tabelle 3: Mutageneseprimer

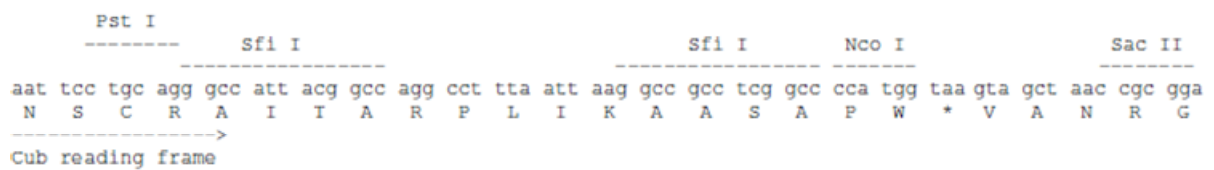
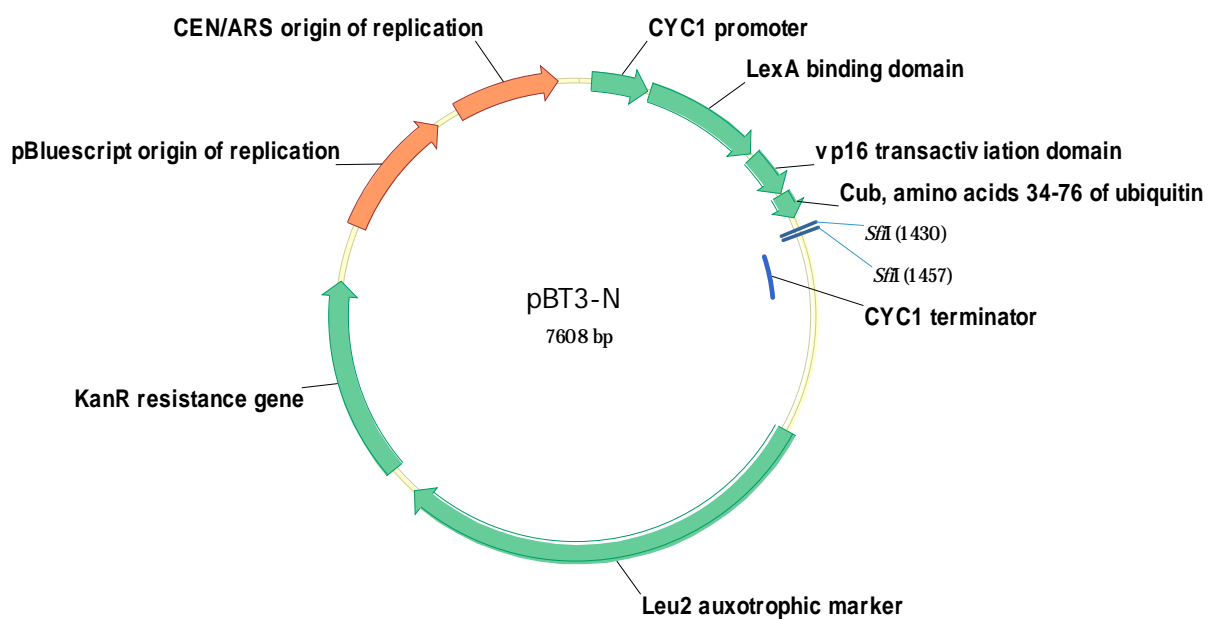
Die Annealingtemperatur betrug standardmäßig 60°C.

2.1.4 Vektoren

2.1.4.1 DUALmembrane System 3 Vektoren:

Type II Bait Vektor (N-terminal fusioniert)

pBT3-N DUALmembrane System 3 Bait Vektor (P03230)

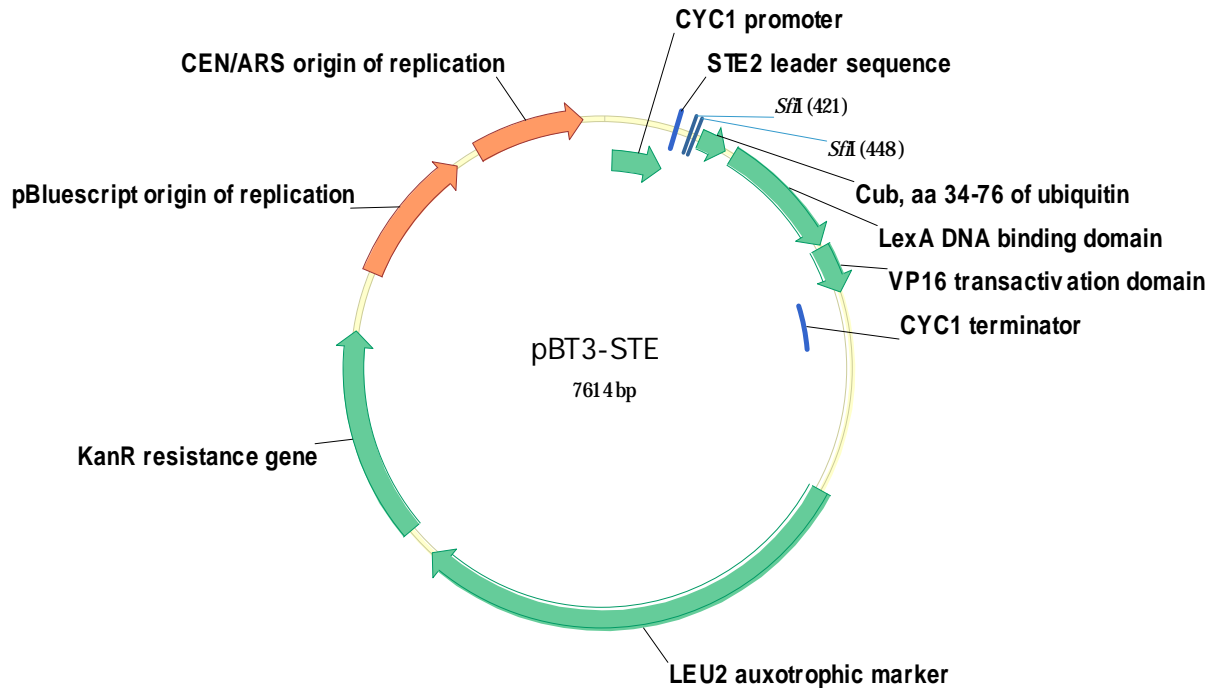


Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 62 End: 352	CYC1 promoter	Start: 2499 End: 4709	LEU2 auxotrophic marker
Start: 364 End: 969	LexA DNA binding domain	Start: 4858 End: 5891	KanR resistance gene
Start: 988 End: 1224	VP16 transactivation domain	Start: 6184 End: 6851	pBluescript origin of replication
Start: 1231 End: 1365	Cub, amino acids 34-76 of ubiquitin	Start: 6973 End: 7512	CEN/ARS origin of replication
Start: 1509 End: 1768	CYC1 terminator		

Type I bait Vektor (C-terminal fusioniert)

pBT3-STE DUALmembrane System 3 Bait Vektor (P03233)



```

          Sfi I                Sfi I                Pst I                Hind III
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gta atg gcc att acg gcc agg cct tta att aag gcc gcc teg gcc atc tgc agg aat tcg ata tca agc tta tcg
V  M  A  I  T  A  R  P  L  I  K  A  A  S  A  I  C  R  N  S  I  S  S  L  S
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
>
STE2 reading frame                                     Cub reading frame
    
```

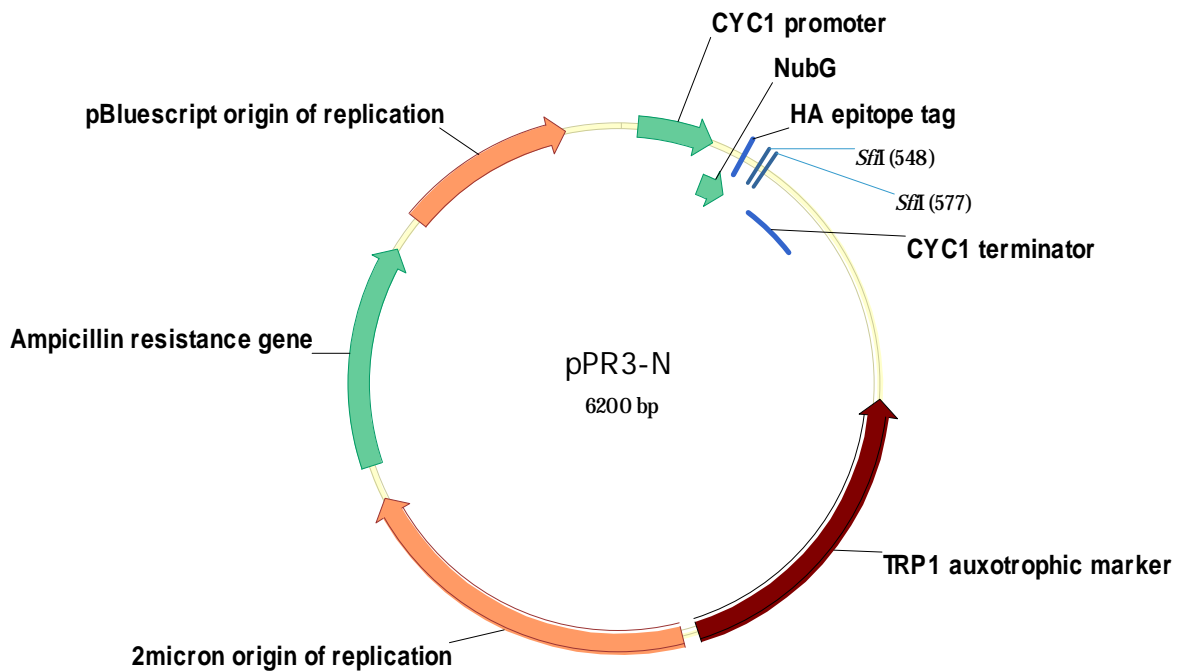
Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 62 End: 352	CYC1 promoter	Start: 1516 End: 1773	CYC1 terminator
Start: 369 End: 407	STE2 leader sequence	Start: 2505 End: 4715	LEU2 auxotrophic marker
Start: 495 End: 629	Cub, amino acids 34-76 of ubiquitin	Start: 4864 End: 5897	KanR resistance gene
Start: 654 End: 1265	LexA DNA binding domain	Start: 6190 End: 6857	pBluescript origin of replication
Start: 1278 End: 1514	VP16 transactivation domain	Start: 6979 End: 7518	CEN/ARS origin of replication

cDNA Datenbank Vektor (NubG-cDNA Orientierung):

Die cDNA Datenbank wurde von Dualsystem gefertigt.

pPR3-N DUALmembrane System 3 Prey Vektor (P03234)



```

                                     Sma I
                                     -----
BamH I                               Sfi I                               Sfi I
-----                               -----                               -----
-
gct gga tcc aag cag tgg tat caa cgc aga gtg gcc att acg gcc cgg gaa aaa aca tgt cgg ccg cct cgg cct ctc
gag
A G S K Q W Y Q R R V A I T A R E K T C R P P R P L
E
----->
NubG-HA reading frame

EcoR I                               Cla I                               Sal I
-----                               -----                               -----
aat tcg ata tca agc tta tcg ata ccg tcg acc
N S I S S L S I P S T

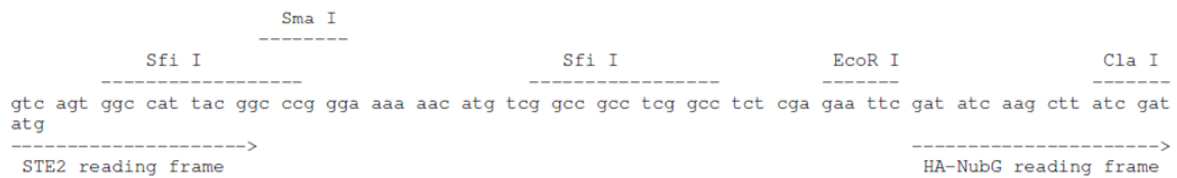
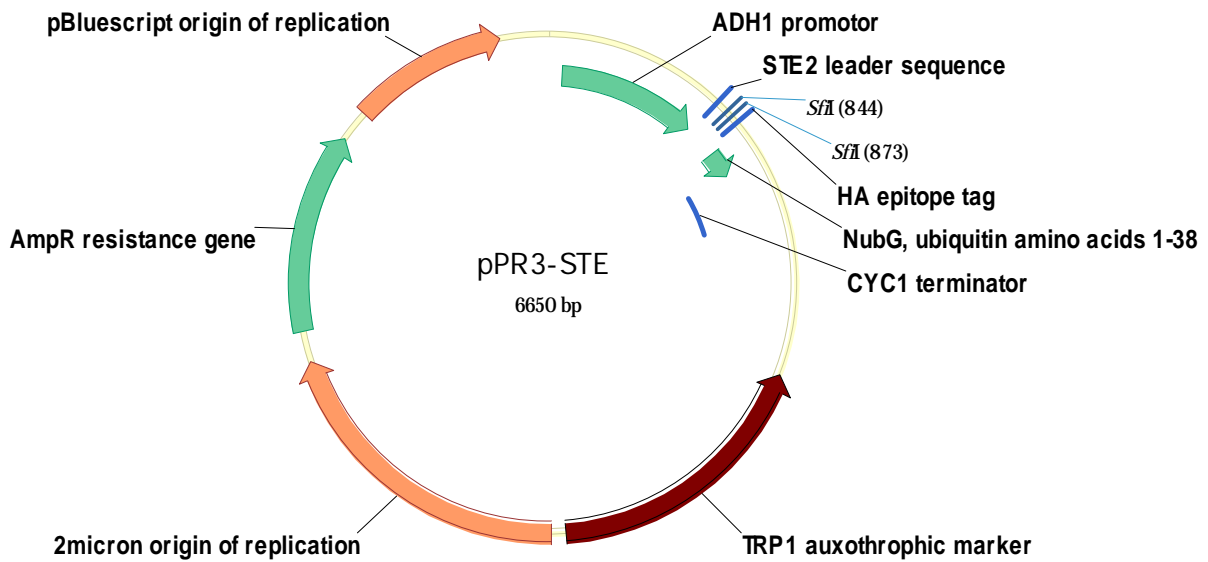
```

Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 62 End: 352	CYC1 promoter	Start: 1598 End: 2791	TRP1 auxotrophic marker
Start: 364 End: 480	NubG, ubiquitin amino acids 1-38	Start: 2855 End: 4202	2micron origin of replication
Start: 481 End: 510	HA epitope tag	Start: 4335 End: 5193	AmpR resistance gene
Start: 622 End: 883	CYC1 terminator	Start: 5328 End: 5995	pBluescript origin of replication

cDNA Datenbank Vektor (cDNA-NubG Orientierung):
 Die cDNA Datenbank wurde von Dualsystem gefertigt.

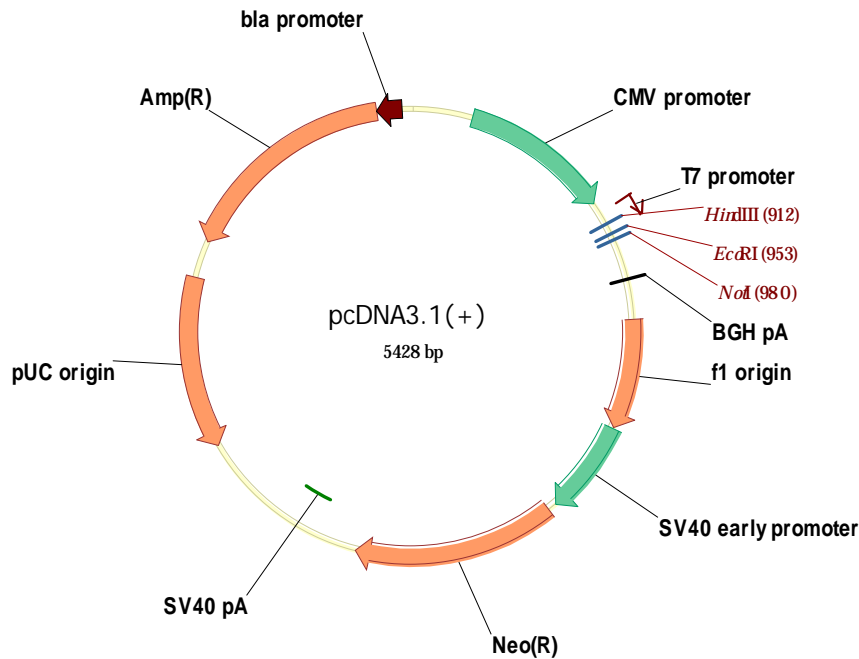
pPR3-STE DUALmembrane System 3 Prey Vektor (P03237)



Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 63 End: 770	ADH1 promoter	Start: 2048 End: 3241	TRP1 auxotrophic marker
Start: 788 End: 835	STE2 leader sequence	Start: 3305 End: 4652	2micron origin of replication
Start: 908 End: 940	HA epitope tag	Start: 4785 End: 5643	AmpR resistance gene
Start: 947 End: 1081	NubG, ubiquitin amino acids 1-38	Start: 5778 End: 6445	pBluescript origin of replication
Start: 1077 End: 1334	CYC1 terminator		

2.1.4.2 HEK293- Expressionsvektoren für Koimmunpräzitations- Studien



enhancer region (3' end)

689 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGT TTTGGCA CAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG

CAAT TATA

749 TAACAACTCC GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT

3' end of hCMV putative transcriptional start

809 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC

T7 promoter/primer binding site

869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC

Nhe I Pme I Afl II Hind III Asp718 I Kpn I

929 GGATCCACTA GTCCAGTGTG GTGGAATTCT GCAGATATCC AGCACAGTGG CGGCCGCTCG

BamH I BstX I* EcoR I EcoR V BstX I* Not I Xho I

989 AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC

pcDNA3.1/BGH reverse priming site

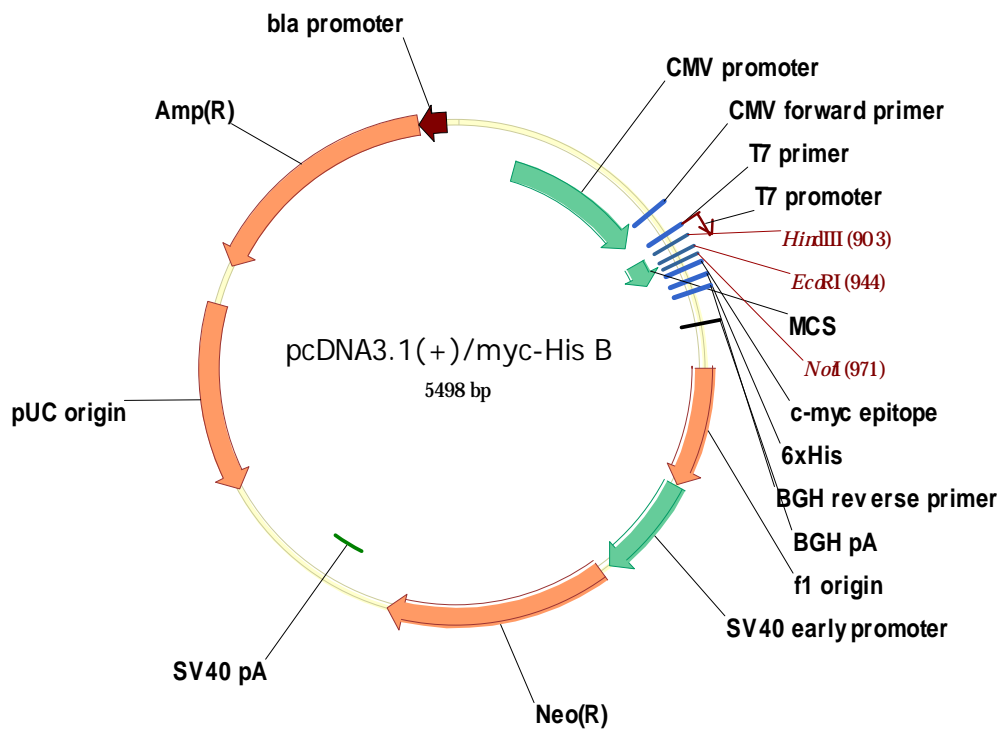
1049 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG

BGH poly (A) site

1109 TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT

Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 232 End: 819	CMV promoter	Start: 2136 End: 2930	Neomycin resistance gene (ORF)
Start: 863 End: 882	T7 promoter/priming site	Start: 3104 End: 3234	SV40 early polyadenylation signal
Start: 895 End: 1010	MCS	Start: 4287 End: 3617	pUC origin
Start: 1028 End: 1252	BGH polyadenylation sequence	Start: 5428 End: 4432	Ampicillin resistance gene
Start: 1298 End: 1726	f1 origin	Start: 5292 End: 4432	ORF
Start: 1731 End: 2074	SV40 early promoter and origin	Start: 5304 End: 5300	Ribosome binding site
		Start: 5333 End: 5327	bla promoter (P3)



```

      T7 promoter/priming site                                Hind III           Kpn I           BamH I
861  ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT TAAG CTT GGT ACC GAG CTC GGA
      Leu Gly Thr Glu Leu Gly

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

      Xho I   Xba I           Apa I  Sac II   Sfu I           myc epitope
977  TCG AGT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT
      Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

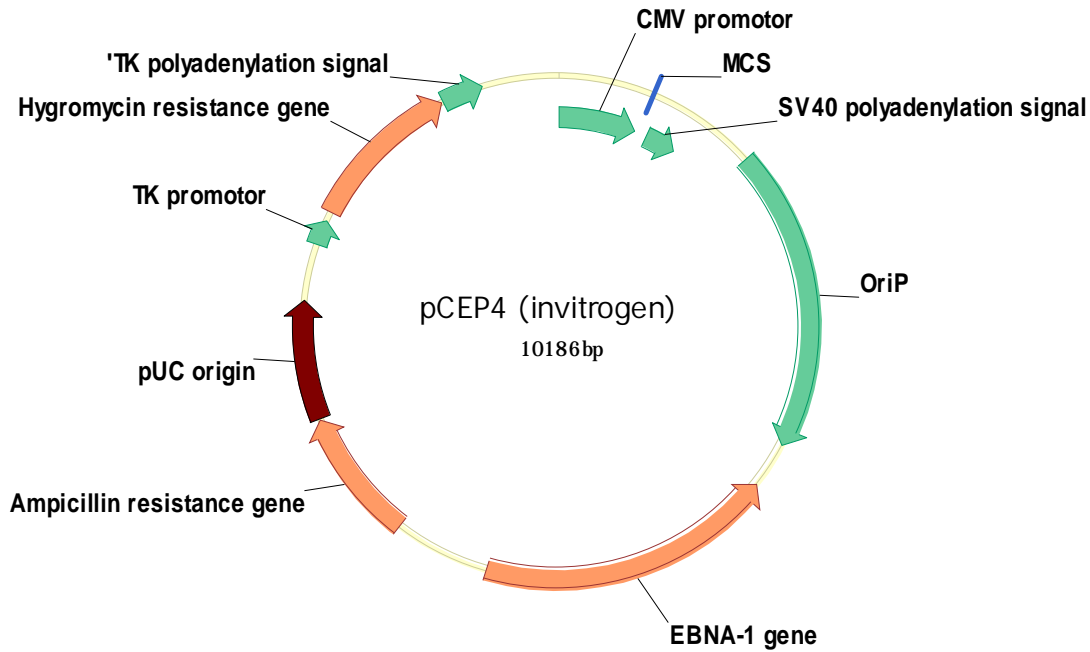
      Age I           Polyhistidine tag           Pme I
1028 CTG AAT ATG CAT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTT AAACCCGCTG
      Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His ***

      BGH Reverse priming site
1081 ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
    
```

Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 209 End: 863	CMV promotor	Start: 1836 End: 2160	SV40 early promotor and origin
Start: 863 End: 882	T7 promotor/priming site	Start: 2196 End: 2990	Neomycin resistance gene (ORF)
Start: 997 End: 1026	myc epitope	Start: 3166 End: 3296	SV40 early polyadenylation signal
Start: 1042 End: 1059	Polyhistidine tag	Start: 3679 End: 4352	pUC origin
Start: 1081 End: 1295	BGH polyadenylation sequence	Start: 5357 End: 4497	Ampicillin resistance gene
Start: 1358 End: 1771	f1 origin		

2.1.4.3 Expressionsvektor für VKOR- Aktivitätsstudien



```

361 TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACACCAAT GGGCGTGGAT
      |
      | AP1
      |
421 AGCGGTTTGA CTCACGGGGA TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT
      |
      | enhancer region (3' end)
      |
481 TTTGGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA AATGTCGTAA TAACCCCGCC CCGTTGACGC
      |
      | CAAT
      |
541 AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT TTAGTGAACC
      |
      | Transcriptional start
      |
601 GTCAGATCTC TAGAAGCTGG GTACCAGCTG CTAGCAAGCT TGCTAGCGGC CGCTCGAGGC
      |
      | Sfi I BamH I
      |
661 CGGCAAGGCC GGATCCAGAC ATGATAAGAT ACATTGATGA GTTTGGACAA ACCACAATA
      |
      | EBV Reverse primer
  
```

Vector features

Position	Feature	Position	Feature
Start: 1 End: 588	CMV promoter	Start: 5357 End: 4497	Ampicillin resistance gene
Start: 685 End: 926	SV40 polyadenylation signal	Start: 7040 End: 7815	pUC origin
Start: 1344 End: 3319	OriP	Start: 8409 End: 9419	Hygromycin resistance gene
Start: 5545 End: 3620	EBNA-1 gene	Start: 9431 End: 9702	TK polyadenylation signal

2.1.5 Zelllinien

HeLa	Ephitelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks, Invitrogen
HEK 293 EBNA	Humane embryonale Nierenzellen (<u>H</u> uman <u>e</u> mryonic <u>k</u> idney), Invitrogen

2.1.6 Bakterienstämme

NEB 5- alpha Competent E. coli (Subcloning Efficiency) wurden von New England Biolabs bezogen (Bestellnummer #C2988J) und in je 25µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.1.7 Hefestamm

NMY51	Hefestamm von Saccharomyces cerevisiae
-------	--

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Technik zur gezielten zyklischen Amplifikation bestimmter Nukleinsäurebereiche, die von Kray B. Mullis 1983 entwickelt und erstmals beschrieben wurde [202].

Die PCR-Reaktion besteht aus drei Teilschritten. In einem ersten Schritt wird durch eine kurze Hitzebehandlung die DNA-Doppelhelix denaturiert. Während des anschließenden Annealings hybridisieren Oligodesoxynukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen, bei geeigneter Temperatur mit ihren komplementären Sequenzen der DNA. Die Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge und dienen im nächsten Schritt als Angriffspunkt für eine temperaturstabile DNA-Polymerase. Während der Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung durch spezifisches Anfügen der Desoxyribonucleosid-Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) den komplementären DNA-Strang. Nach einem wiederholten Denaturierungsschritt dienen nun die beiden neu synthetisierten Fragmente ihrerseits als Matrize. So kommt es im optimalen Fall zu einem exponentiellen Wachstum des ausgewählten DNA-Fragments (2^n) bei weiteren Zyklen mit den

jeweiligen Schritten Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. In der Regel wurden 30 Zyklen durchlaufen.

2.2.1.1 Auswahl der Primer

Die Primer wurden mit Hilfe eines Internet-Programms (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt. Mutageneseprimer und Klonierungsprimer wurden „manuell“ bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.4 und 2.2.6).

2.2.1.2 Amplifikationsreaktion

Die PCR-Bedingungen richteten sich nach der Art der Amplifikation (Klonierung, Sequenzierung etc.). Die verwendeten Annealing-Temperaturen sind bei den jeweiligen Oligonucleotiden vermerkt. Die Elongationszeiten richten sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Die verwendeten Polymerasen amplifizieren ca. 500bp/min.

Verwendete Lösungen:

dNTP-Mix	1,25mM	dATP
	1,25mM	dCTP
	1,25mM	dGTP
	1,25mM	dTTP
10 x PCR-Puffer	500mM	KCl
	200mM	Tris/HCl (pH 8,4)
1 x PCR-Puffer	100µl	10 x PCR-Puffer
	160µl	dNTP-Mix
	30µl	50mM MgCl ₂
	630µl	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz für eine PCR setzt sich wie folgt zusammen:

25µl	1 x PCR-Puffer
1µl	F-(forward) Primer (10pmol/µl)
1µl	R-(reverse) Primer (10pmol/µl)
1µl	DNA (ca. 100ng)
0,3µl	Taq-Polymerase

Der PCR-Reaktionsansatz durchläuft in einem Thermocycler folgendes Amplifikationsprogramm:

95°C	5 min	} 30 Zyklen
95°C	30 s	
Annealing Temp.	30 s	
72°C	Elongationzeit s	
72°C	3 min	

2.2.1.3 Kolonie-PCR

Mittels der Kolonie-PCR kann man Sequenzabschnitte von Plasmiden aus Bakterien amplifizieren, ohne diese vorher zu isolieren. Anstelle der sonst verwendeten DNA (1µl) setzt man ein Aliquot von 3µl einer Bakterienkolonie zu. Die MgCl₂ Konzentration im Ansatz wurde wie folgt erhöht:

$$\text{Volumendifferenz} \times \text{Anzahl der Klone} \times \text{vorhandene MgCl}_2 \text{ Menge} / \text{Volumen}_{\text{gesamt}}$$

Kolonie-PCRs liefen standardmäßig bei einer Annealingtemperatur von 55°C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (vgl. Abschnitt 2.1.2.2)

2.2.1.4 Mutagenese-PCR

Durch einen gezielten Austausch von Nucleotiden lassen sich Proteinregionen charakterisieren. Mutationen wurden durch das sogenannte QuickChange Verfahren eingefügt. Hierbei wurde jeweils eine Punktmutation durch PCR direkt in die in einem Vektor befindliche cDNA eingefügt. Das hierfür verwendete Primerpaar hat je 15 spezifische Nucleotide 3' und 5' – seits der zu verändernden Base. Die Amplifikation erfolgte mittels Pfu- Polymerase in entsprechendem Puffer. Die Pfu- Polymerase besitzt 3'-5'-Exonuklease Aktivität und 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Um Wildtyp- DNA nach der Amplifikation aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde der PCR-Ansatz mit *DpnI*- Endonuclease verdaut. *DpnI* spaltet ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA. Da PCR-Produkte nicht methyliert werden, wurde das neusynthetisierte mutierte Plasmid nicht verdaut und, wie in 2.2.6.3 beschrieben, in einen Bakterienstamm transformiert.

Verwendete Lösungen:

10 x Pfu-Puffer	100mM	KCl
	200mM	Tris/HCl (pH 8,8)
	100mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	20mM	MgSO ₄
	1%	Triton x-100
	1mg/ml	BSA
1 x Pfu-Puffer	100µl	10 x PCR-Puffer
	160µl	dNTP-Mix (siehe Abschnitt 2.2.1.2)
	640µl	ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz für eine Mutagenese- PCR setzt sich wie folgt zusammen:

25µl	1 x Pfu-Puffer
1µl	F-(forward) Primer (10pmol/µl)
1µl	R-(reverse) Primer (10pmol/µl)
0,5µl	DNA (ca. 50ng)
0,5µl	Pfu-Polymerase

Der PCR-Reaktionsansatz durchläuft in einem Thermocycler folgendes Amplifikationsprogramm:

95°C	3 min	} 18 Zyklen
95°C	30 s	
60°C	1 min	
68°C	18 min	
15°C	Pause	

5 µl des PCR-Produktes wurde auf ein 2%iges Agarosegel auftragen. Die restlichen 20µl PCR-Produkt wurden mit 0,5µl *DpnI* für 1 h bei 37°C verdaut.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe und Reinheit des amplifizierten PCR-Produktes wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Agarose bildet ein Gel aus engmaschigen Poren, in denen negativ geladene DNA-Doppelstränge abhängig von ihrer Größe bei einer angelegten

Spannung in Richtung der Anode aufgetrennt werden. Die verwendete Agarosekonzentration der Gele richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente.

Verwendete Lösungen:

50 x TAE-Puffer	242g	Tris
	57,1ml	konzentrierte Essigsäure
	100ml	0,5M Na ₂ EDTA (pH 8,0)
	ad 1l	ddH ₂ O
10 x Stoppuffer	50%	Saccharose
	0,1%	Bromphenolblau
	0,1M	Na ₂ EDTA (pH 6,8)
	ad 1l	ddH ₂ O

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte standardmäßig auf 2%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgeköcht und nach Abkühlen auf 50-60°C 10µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Durch Ethidiumbromid können DNA-Moleküle unter UV-Licht (320nm) sichtbar gemacht werden. 5µl PCR-Produkt bzw. 20µl Spaltprodukt wurden vor dem Auftragen mit 2µl bzw. 5µl 10x Stoppuffer versetzt, um die Lauffront durch das dunkelblaue Bromphenolblau anzuzeigen und das Absinken der Probe in die Geltasche durch sein Gewicht zu erleichtern. Ein TAE-Gel läuft bei einer Spannung von 120V ca. 30min. Die Größen der PCR-Produkte können anhand eines 100bp-Ladder bestimmt werden, der parallel zu den Proben auf dem Gel mit aufgetragen wird.

2.2.3 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der amplifizierten DNA wurde der *illstra*TM *GFX*TM PCR DNA and Gel Band Purification Kit von GE Healthcare verwendet. Es wurde nach beiliegendem Protokoll gearbeitet und zum Schluss in 30µl ddH₂O eluiert. Zuvor wurde beim Ausschneiden der DNA-Bande aus dem Agarosegel darauf geachtet, möglichst nicht bzw. nur sehr kurz unter UV-Licht zu arbeiten. Ab ca. 2µg DNA ist eine rote Bande auch ohne UV- Licht klar im Agarosegel sichtbar.

2.2.4 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienkultur

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem NucleoBond PC 100 Midi Kit von Macherey & Nagel. Dieses Kit arbeitet nach dem Prinzip einer alkalischen Lyse in Kombination mit einer Silikatmembran, die selektive und reversible Nukleinsäure-Bindungseigenschaften besitzt. Sämtliche benötigten Lösungen und Materialien sind im Lieferumfang des Kits enthalten. Es wurde nach beiliegendem Protokoll gearbeitet. Die isolierten Plasmide wurden in TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration als auch die Reinheit photometrisch mittels des NanoDrop 1000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Die eluierten Plasmide wurden entweder direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5 Präparative Plasmidisolierung aus Hefekulturen

Die Präparation von Plasmiden aus Hefen erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid QuickPure Kits von Macherey & Nagel. Hierzu wurden 750ml SD-trp-leu Medium (siehe Abschnitt 2.3.2) mit Klonen angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 250µl Resuspensionspuffer (A1) aus dem Kit wurden zugegeben, resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf Gefäß überführt. Zur Lyse der Hefemembran wurden zusätzlich ca. 100µl 1mm kleine Glasperlen zugegeben und 5 min gut gevortext. Das Lysat wurde auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben und 1 min bei 6000g zentrifugiert. Zum Waschen wurde zweimal 500µl A3 Puffer und anschließend 600µl A4 Puffer zugegeben. Nach jedem Waschschrift wurde 1 min bei 11000g zentrifugiert und nach dem letzten Waschschrift wurde noch einmal für 2 min bei 11000g zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Eluiert wurde durch Zugabe von 50µl Elutionspuffer (AE) und 1 min Zentrifugation bei 11000g. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben weiter analysiert.

2.2.6 Klonierung

Die DNA-Klonierung ist eine Technik zur Vermehrung wirtsfremder DNA in Zellkultur. Spezifische genomische DNA Fragmente bzw. cDNA werden in einen Klonierungsvektor eingebaut, der dann in kultivierbare Wirtszellen eingeschleust und durch diese vermehrt wird. Als Klonierungsvektor dienen u.a. Plasmide die Antibiotikaresistenzgene tragen. Der Klonierungsvektor sowie die genomische DNA werden mit demselben Restriktionsenzym geschnitten, so dass beide DNA-Stücke die gleichen Restriktionsschnittstellen an ihren Enden

besitzen. Die verwendeten Schnittstellen sind in Tabelle 1 bei den jeweiligen Primerbezeichnungen aufgelistet. Durch die Restriktion entstehen optimalerweise überhängende Enden („sticky ends“), die sich binden und durch die DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch kovalent miteinander zu einem rekombinanten DNA-Ring verbunden werden. Die Plasmide werden in kompetente Bakterienzellen transformiert, die dann wiederum bei ihrer eigenen Teilung auch die rekombinanten Plasmide replizieren. Auf diese Weise entsteht eine große Anzahl von Plasmidkopien.

Zur Identifikation und Selektion der Bakterien, die erfolgreich ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, nutzt man die Antibiotikaresistenzgene des Plasmids. So wachsen auf einer antibiotikahaltigen Nährplatte nur diejenigen Bakterien, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben. Die entstandenen Klone können anschließend einzeln isoliert und gezielt vermehrt werden.

Der Reaktionsansatz für eine Klonierungs-PCR setzt sich wie folgt zusammen:

200µl	1 x Pfu-Puffer
4µl	F-(forward) Primer (10pmol/µl)
4µl	R-(reverse) Primer (10pmol/µl)
1µl	DNA (ca. 100ng)
2µl	Pfu-Polymerase

Der Klonierungs- PCR- Reaktionsansatz durchläuft in einen Thermocycler folgendes Amplifikationsprogramm:

95°C	5 min	} 30 Zyklen
95°C	30 s	
60°C	30 s	
72°C	Elongationzeit s	
72°C	5 min	

2.2.6.1 DNA-Verdau und Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA hydrolyseren, wobei jede Restriktionsendonuklease eine spezifische, meist palindromartige Sequenz erkennt.

Durch anhängen von Restriktionsschnittstellen an eine DNA-Sequenz mittels PCR kann man Vektor und Insert mit den gleichen Enzymen spalten (siehe auch 2.2.6).

Die Spaltung erfolgte mit Enzymen und den dazu gehörigen Puffern der Firma New England Biolabs (NEB) nach beiliegendem Protokoll. Das Spaltungsprodukt wurde auf ein Agarose Gel gegeben und ca. 1h bei 150V laufen gelassen. Die DNA wurde, wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben, aufgereinigt und von dem Eluat wurde erneut 1µl auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Quantifikationshilfe wurden auf demselben Gel 4µl eines Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen) aufgetragen.

2.2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach Spaltung von Vektor und Insert wurden die Konstrukte mit dem Quick Ligase Kit (NEB) ligiert. Dabei wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Ligationsmix	10µl	2x Quick Ligase Puffer (NEB)
	6µl	Insert
	3µl	Vektor
	1µl	T4-Ligase [1U] (NEB)

Der Ligationsmix wurde für 10min bei 25°C inkubiert.

2.2.6.3 Transformation von Plasmiden in E.coli DH5α

Bei einer Transformation wird isolierte Fremd-DNA in ein Bakterium aufgenommen. Die DNA muss als Plasmid vorliegen, damit sie nicht von dem Bakterium zerstört wird.

25µl der chemisch kompetenten Bakterien-Zellen DH5 alpha (NEB 5-alpha Competent E.coli #C2988J) werden auf Eis aufgetaut und mit 2,5µl Ligationsansatz versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis und anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 30 sek werden die Bakterien auf Eis abgekühlt. Anschließend wird jeder Ansatz mit 250µl LB-Medium versetzt und für 1h bei 37°C auf einem Thermomixer (350rpm) inkubiert. Die Bakterien werden nun, wie in 2.3.1.1.

beschrieben, auf Agarplatten kultiviert und nach der Isolierung von positiven Einzelklonen, wie in 2.3.1.3. beschrieben, für die Plasmidisolierung in einer Flüssigkultur vermehrt.

2.2.7 DNA- Sequenzierung nach Sanger

Mittels Sequenzierung wurden alle verwendeten Plasmide auf ihre Richtigkeit in Bezug auf die Nukleotid-Abfolge überprüft. Die Sequenzierung erfolgte mittels Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden nach Sanger [203]. Hierzu wurde mit einem Genetic Analyzer 3130xl Sequenzer und dem BigDye® Terminators v1.1 von Applied Biosystems gearbeitet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Codon Code Aligner Programm (www.codoncode.com/aligner/).

2.2.7.1 Sequenzierprotokoll

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten werden zunächst überschüssige Primer und Nukleotide mittels spezifischer Enzyme abgebaut. Dabei werden zu 1µl PCR-Produkt 0,25µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, 2U/µl), 0,25µl *Exonuklease I* (10U/µl) und 5,5µl ddH₂O gegeben. Für die Reinigung wird der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme 15 min auf 85°C erhitzt. Der komplette Verdau wurde in die anschließende Sequenzierreaktion eingesetzt.

Bei Direktsequenzierung aus Bakterienkulturen wurden 20µl LB-Medium mit Bakterien für 10 min bei 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10µl H₂O gelöst und für 3 min auf 95°C denaturiert. Von dem Bakterienlysate wurden 2µl in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Plasmide wurden direkt sequenziert. Hierfür wurden 120 bis 300ng in die Reaktion eingesetzt.

Sequenzieransatz:	7µl PCR-Produkt oder ~ 200ng Plasmid oder 2µl Klon (aus 10µl denat.)
	2,0µl 5x Puffer
	0,5µl Primer (10 pmol/µl)
	1,0µl Big Dye
	ad 10µl H ₂ O

Der Sequenzier-Reaktionsansatz durchläuft in einem Thermocycler folgendes Amplifikationsprogramm:

Programm:

96°C	2,30 min	} 25 Zyklen bei PCR-Fragmenten u. Plasmiden und 50 Zyklen bei Klon-Sequenzierung
98°C	20 s	
60°C	1,30 min	
50°C	2 min	
50°C	3 min	

2.3 Zellbiologische und enzymologische Methoden

2.3.1 Bakterienkultur

2.3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Verwendete Lösungen:

LB-Medium (ph 7,5):	10g	Trypton
	5g	Hefe-Extrakt
	10g	NaCl
	2,5g	MgSO ₄
	ad 1l	ddH ₂ O
Antibiotika Konzentration	100 µg/ml	Carbenicilin
	25 µg/ml	Kanamycin

2.3.1.2 Bakterienwachstum auf Agarplatten

Das LB-Medium wird wie oben beschrieben angesetzt, 15g Agar zugegeben und autoklaviert. Zu dem leicht abgekühlten Medium gibt man die angegebenen Mengen des Antibiotikums. Das Medium wird in Plastikpetrischalen gegossen, so dass der Boden bedeckt ist und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Anzucht der Bakterien auf den Agarplatten werden 250µl einer Bakteriensuspension auf die Agarplatte pipettiert und mit sterilen Glasperlen (5mm Durchmesser, Roth) gleichmäßig verteilt. Die Petrischale wird über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.3.1.3 Vermehrung von Bakterien über Flüssigkulturen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wird eine Einzelkolonie von der Agarplatte isoliert und in eine sterile 96 Well-Platte überführt. Die Platte enthält pro Well 200µl LB-Medium mit Antibiotika. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Plasmidpräparationen wird aus den Kulturen 50µl in 100ml LB-Medium mit Antibiotika überführt und wiederum über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Daran schließt sich eine Plasmidpräparation, wie unter 2.2.4. beschrieben, an.

2.3.2 Hefekultur

2.3.2.1 Anzucht von Hefekulturen

Verwendete Lösungen:

Dropout Mix:	0,61g ad 1l	CSM (Complete Supplement Mixture) ddH ₂ O
---------------------	----------------	---

15min bei 121°C autoklavieren und bei 4°C lagern.

SD-trp-leu-Medium (ph 7,5):	0,7% 0,1% 0,02g/l 0,02g/l ad 1l	Yeast nitrogen base w/o amino acids Dropout Mix Ade His ddH ₂ O
------------------------------------	---	--

15min bei 121°C autoklavieren.

Nach abkühlen 2% Glucose monohydrate (steril filtriert) zugeben und bei 4°C lagern.

2.3.2.2 Hefewachstum auf Selektionsmedium

Das SD-trp-leu-Medium wird wie oben beschrieben angesetzt, 20g Agar zugegeben und autoklaviert. Nach abkühlen auf ca. 50°C werden 2% Glucose monohydrate (steril filtriert) zugegeben. Das Medium wird in Plastikpetrischalen gegossen, so dass der Boden bedeckt ist und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Anzucht der Hefen auf den Agarplatten werden 300µl einer Hefesuspension auf die Agarplatte pipettiert und mit sterilen Glasperlen (5mm Durchmesser, Roth) gleichmäßig verteilt. Die Petrischale wird über Nacht im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

2.3.2.3 Vermehrung von Hefen über Flüssigkulturen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wird eine Einzelkolonie von der Agarplatte isoliert und in eine sterile 96 Well-Platte überführt. Die Platte enthält pro Well 200µl SD-trp-leu-Medium. Die Kulturen werden über Nacht bei 30°C inkubiert. Für Plasmidpräparationen wird aus den Kulturen 50µl in 750µl SD-trp-leu-Medium überführt und wiederum über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Daran schließt sich eine Plasmidpräparation, wie unter 2.2.5. beschrieben, an.

2.3.3 Kultivierung von Säugerzelllinien

Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, vor der Verwendung auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Säugerzelllinien HEK293 EBNA und HeLa erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in 75cm² Corning® Zellkulturflächen.

2.3.3.1 HEK293-EBNA

Für Proteinexpressionsstudien wurden HEK293-EBNA Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um „**H**uman **E**mbrionic **K**idney“-Zellen, also menschliche embryonale Nierenzellen.

Für die Langzeitkultur wurde folgendes Medium verwendet:

MEM-Medium + 12% inaktiviertes FKS + 250µg/ml G418 + 1% NEAA

Für Expressionsstudien wurde folgendes Medium verwendet:

MEM-Medium + 10% inaktiviertes FKS + 1% NEAA

2.3.3.2 HeLa Zellen

Für die Co- Lokalisation von Proteinen wurden HeLa-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin **Henrietta Lacks**.

Für HeLa-Zellen wurde standardmäßig folgendes Medium verwendet:

DMEM-Medium + 10% inaktiviertes FCS + 1% PenStrep

2.3.3.3 Subkultivieren von Säugerzellen

Bei einer Zelldichte von ca. 90% ist das Passagieren und Verdünnen der Zellkultur nötig. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 10ml PBS gewaschen und anschließend ca. 2 min mit 2ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (10x Trypsin/EDTA von PAA) inkubiert. Dadurch kommt es zu einer partiellen Zerstörung von Oberflächen-Zellwand-Wechselwirkungen und damit zur Ablösung adhärenter Zellen. Zu den abgelösten Zellen in 1x Trypsin/EDTA-Lösung gibt man 8ml spezifisches Zellmedium (siehe Abschnitt 2.3.2.1 bzw. 2.3.2.2). Die Zellen werden durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 1ml in eine neue Zellkulturflasche mit 14ml vorgelegtem Medium gegeben.

2.3.3.4 Langzeitlagerung von Säugerzelllinien

Die Herstellung von kryokonservierten Zellstocks ist eine unerlässliche Methode, da immer die Gefahr besteht, dass Zellen differenzieren bzw. kontaminieren. Zusätzlich wurde bei der Proteinexpression darauf geachtet, dass die Zellen max. 30mal passagiert wurden, um eine gleichbleibende Zellexpression zu gewährleisten.

Zum Einfrieren wurden die Zellen, wie beim Subkultivieren (siehe Abschnitt 2.3.3.3), trypsiniert. Die Trypsin/EDTA Lösung wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in 5ml „Einfrier-Medium“ resuspendiert. Das „Einfrier-Medium“ besteht aus dem jeweiligen Standardmedium mit 5% DMSO. Die Zellsuspension wurde in 1,5ml NUNC-Röhrchen aliquotiert und in einer Cryo-Box mit Isopropanol in -70°C für eine Woche langsam eingefroren bevor sie letztlich in flüssigen Stickstoff bei -196°C konserviert wurden.

Bei Reaktivierung der Zellstocks wurden die Zellen schnellstmöglich in einem 37°C-Wasserbad zu 50 bis 80% aufgetaut. Diese Zellen wurden in eine Zellkulturflasche mit 13,5ml Medium überführt. Nach 24h wurde das Medium gewechselt.

2.3.4 Zellzahlbestimmung

Für die Reproduzierbarkeit von Zellkulturversuchen wurde die Zellzahl durch Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer am Mikroskop bestimmt. Es wurden standardmäßig $2,2 \times 10^6$ Zellen ausgesät und nach 48h transfiziert.

2.3.5 Transfektion von Säugerzellen

Die transiente Transfektion zur Expression von Genen in HEK 293 EBNA- und HeLa-Zellen wurde mittels FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Roche Applied Science) durchgeführt. Hierzu sollen die Zellen ca. 80% konfluent sein. Das Zellmedium wurde 1h vor der Transfektion abgenommen und durch MEM-Medium mit 10% deaktivierten FKS ersetzt.

Für die Transfektion wurde standardmäßig eine 10cm Kulturschale verwendet. Dafür wurden 10µg DNA in 500µl Serum-freien MEM-Medium gelöst (Opti-MEM von Invitrogen) und 35µl FuGene HD zugegeben. Die Transfektionslösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine 10cm-Kulturschale getropft. Die Expression erfolgte 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

2.3.6 Epoxidierung von Vitamin K-Chinon

Für den VKOR-Aktivitätsassay (Abschnitt 2.3.7) wurde Vitamin K Epoxid benötigt. Die Epoxidierung erfolgte nach Tishler et.al. [4]. Hierfür wurde 1g Vitamin K1- bzw. Vitamin K2-Chinon (jeweils von SIGMA) in 50ml 100% Ethanol gelöst und rührend auf 75°C erwärmt. Anschließend wurden 2ml Wasserstoffperoxid (mind. 30%ig) und 2ml 50%iger Natriumcarbonatlösung zugegeben und 1 Stunde rührend bei 75°C inkubiert. Ein Farbumschlag von gelb nach blassrosa sollte zu sehen sein.

Der Ansatz wurde für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur rührend inkubiert. Am nächsten Tag wurde das ausgefallene Natriumcarbonat abfiltriert und das Ethanol mittels eines Rotationsverdampfers in einem 50°C Wasserbad entfernt. Für die Extraktion wurde ca. 40ml Diethylether zugegeben und geschüttelt. Für eine bessere Phasentrennung im Scheidetrichter wurde ein halber Spatel wasserfreies Natriumsulfat zugegeben. Die obere Etherphase wurde in einem Glasschraubgefäß aufgefangen, während die untere Wasserphase erneut mit Ether extrahiert wurde. Die Etherphase wurde unter Stickstoff verdampft (auf 50°C Heizblock). Das entstandene Vitamin K-Epoxid ist ein gelbliches Öl. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.3.7 VKOR-Assay

VKOR wurde in HEK 293-EBNA Zellen exprimiert. Die Zellextrakte wurden für den enzymatischen Nachweis der VKOR-Aktivität wie folgt präpariert:

Die HEK-Zellen einer 10cm-Zellkulturschale wurden in ein 15ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert (4°C, 1000g, 5 min.). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit je 10ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl 2% CHAPS gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 40 µl 250 mM Imidazol und erneut eine 10 min Inkubation auf Eis. Abschließend wurden 230 µl Glycerin (87 %) und 20 µl dH₂O zugegeben. Das Zellhomogenat wurde entweder direkt für den folgenden Versuch verwendet oder bei -80°C gelagert.

Der enzymatische Nachweis der VKOR beruht auf der Reduktion des Vitamin K1-Epoxids zum Vitamin K-Chinon im Zellhomogenat. Er wurde immer auf Eis durchgeführt.

Zu 10µl des Zellhomogenats wurden 490µl Puffer B (25mM Imidazol pH 7,6; 0,5% CHAPS) gegeben. Es folgte die Zugabe von 5 mM DTT (Dithiothreitol). Der Ansatz wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 5mM CaCl₂. Je nachdem, ob eine Warfarin-Hemmung untersucht werden sollte, wurde Warfarin, gelöst in DMSO, in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Zu dem Reaktionsansatz wurde 8µM Vitamin K-Epoxid (VKO; in Ethanol) gegeben.

Die Reaktion erfolgte für 1h bei 30°C und wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Isopropanol/Hexan (3:2) gestoppt. Durch kurzes Zentrifugieren trennte sich das Gemisch in zwei Phasen. Es wurden 250 µl der Hexan-Phase abgenommen und in neues Cap überführt. Die Hexan Phase wurde unter Vacuum eingetrocknet und in 50 µl Methanol gelöst. Die Ermittlung der VKOR-Aktivität erfolgte durch chromatografische Auftrennung und Detektion des gebildeten Chinons an der HPLC mittels DAD-Detektor bei 254nm (siehe Abbildung 11). Als Laufmittel wurde Methanol (1,3 ml/min) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Eurochrom for Windows (Version 3.05) von Knauer.

Da zur Auswertung eine Quantifizierung des enzymatischen Umsatzes von Vitamin K-2,3-Epoxid nötig war, wurde zunächst eine Vitamin K1- und K2- Chinon Konzentrationsreihe (0,01-

0,2nmol Chinon) an der HPLC gemessen, wodurch die Quantifizierung des Produktes möglich wurde.

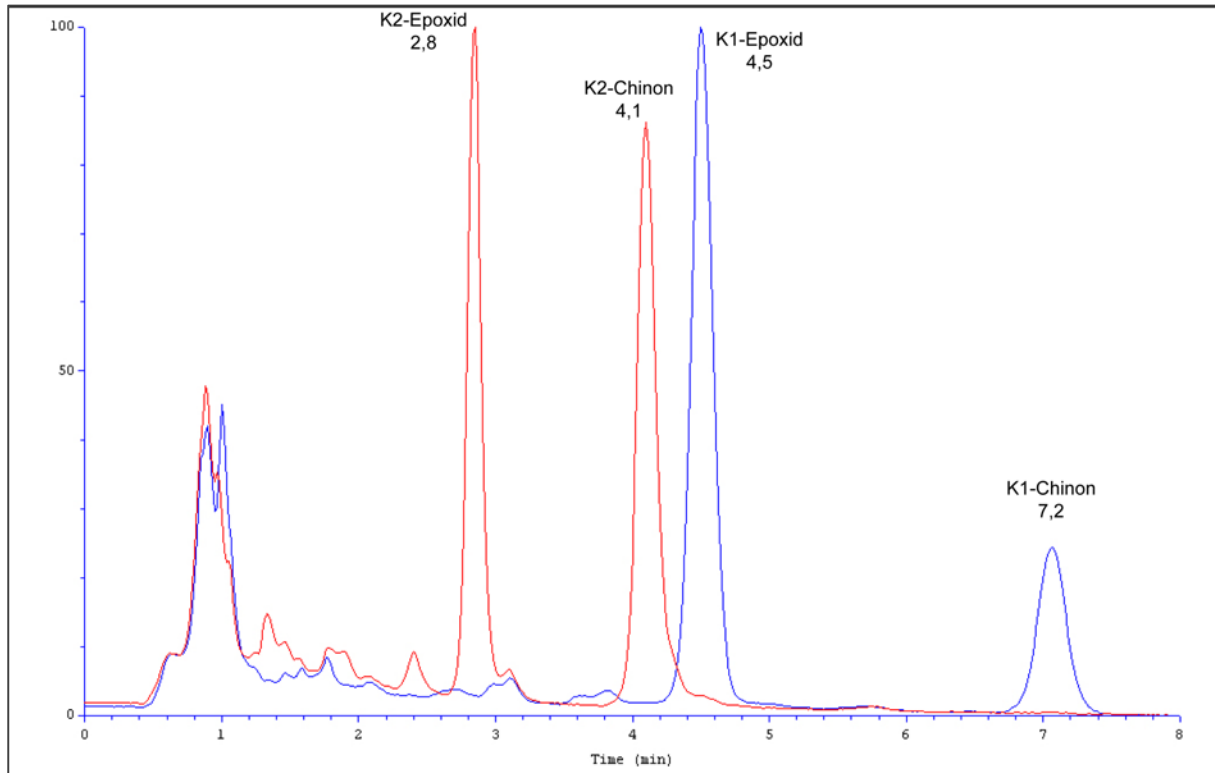


Abbildung 11: **HPLC-Auftrennung von Vitamin K-Epoxid und -Chinon.**

Vitamin K2 Epoxid detektiert nach 2,8 min das dazugehörige Chinon bei 4,1 min (rote Linie). Vitamin K1-Epoxid hat seinen Peak bei 4,5 min während das Chinon nach 7,2 min einen Peak liefert (blaue Linie) Laufbedingungen: 1,3ml/min Methanol, 8min Laufzeit, 254nm Wellenlänge.

Die Chinonkonzentration in μM ließ sich wie folgt berechnen:

$$\text{Chinonkonz. } c \text{ } (\mu\text{M}) = \text{Chinon-HPLC-Fläche} / \text{Steigung der Chinoneichgeraden}$$

Die Chinonkonzentration in nmol konnte über die Beziehung $n = c \times \text{Vol}$ (Reaktionsansatz= 500 μl) berechnet werden.

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die gemessene HPLC-Chinonfläche ins Verhältnis zur Chinon- und Epoxidfläche gesetzt. Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde die gebildete Chinonmenge auf die jeweilig eingesetzte Proteinmenge bezogen. Daraus ergibt sich folgende Rechnung:

$$\text{Aktivität [nmol/mg]} = \text{Chinonmenge [nmol]} / \text{Proteingesamtmenge [mg]}$$

2.3.8 Kinetik von VKORC1L1

Um die Funktion von VKORC1L1 besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit kinetische Studien zu VKORC1L1 angefertigt.

2.3.8.1 K_M und V_{MAX}

Um die kinetischen Eigenschaften von VKORC1L1 genauer zu charakterisieren, wurde die Michaelis Menten Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{MAX} bestimmt. Hierfür wurde die Eigenschaft von VKORC1L1, Vitamin K-Epoxid (KO) zum Vitamin K-Chinon (KH₂) zu reduzieren, zur Bestimmung der enzymatischen Konstanten für Vitamin K1- und K2-Epoxid als Substrate genutzt.

Um die VKOR Umsatzrate zu bestimmen wurde der VKOR-Assay, wie in Abschnitt 2.3.6. beschrieben, durchgeführt. Für die Bestimmung von K_M und V_{MAX} wurden unterschiedliche Mengen Vitamin K-Epoxid eingesetzt [0 μ M - 256 μ M], um die VKORC1L1 Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen zu ermitteln.

Als interne Extraktionskontrolle wurde zusätzlich nach Abstoppen der Reaktion das jeweilige nicht als Substrat verwendete Epoxid [K₁O oder K₂O; jeweils 8 μ M] hinzugefügt.

Die Quantifizierung der gebildeten Chinonkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung des Extraktionsstandards mittels der Peakfläche. Durch die doppelt reziproke Auftragung der gebildeten Produkte wurden anschließend die Konstante K_M und V_{MAX} für Vitamin K₁ und K₂ errechnet.

2.3.8.2 Hemmung von VKORC1L1 mit Warfarin

Da Warfarin ein Inhibitor der VKORC1 wie auch der VKORC1L1 ist, wurde die Hemmwirkung untersucht, indem unterschiedliche Konzentrationen von Warfarin [0 μ M – 100 μ M] vor Zugabe des Substrates in den VKOR-Assay eingesetzt wurden. Anschließend wurde der Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.3.8.3 Zeitabhängige Hemmung von VKORC1L1 mit Warfarin

Die Hemmwirkung von Warfarin wurde auch zeitabhängig untersucht, indem 10 μ M Warfarin vor Zugabe des Substrates in den VKOR-Assay eingesetzt wurden und die Reaktion nach 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20; 30 und 60 min gestoppt wurde.

2.3.8.4 Vitamin K₁ versus K₂

Da Vitamin K₁ als auch K₂ im menschlichen Körper vorhanden sind, wurde im Zuge der Kinetik untersucht, wie die Substrate konkurrierend auf die VKORC1L1 wirken. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen Vitamin K₁- bzw. K₂- Epoxid in gegensätzlichen Konzentrationen (0-100%; 100%= 400 μ M) in den Standard-VKOR-Assay eingesetzt.

2.3.9 Protein Kolokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zur subzellulären Lokalisation wurden die gewünschten Proteine in HeLa-Zellen rekombinant exprimiert (siehe Abschnitt 2.3.5). Da hierbei die Kolokalisation von VKORC1 mit potentiellen Interaktionspartnern zur Frage stand, wurde VKORC1 C-terminal Flag getaggt (DYKDDDDK) und die anderen Proteine N-terminal Myc getaggt (EQKLISEEDL). Die Kultivierung und Transfektion der HeLa- Zellen erfolgte in 12-well Kulturschalen auf sterilen Deckgläsern unter Standardbedingungen. Für jedes Protein wurde 1 μ g Plasmid-DNA in die Transfektion eingesetzt (entsprechend 2 μ g Gesamtplasmid), wobei bei Einzeltransfektionen leerer Vektor zugegeben wurde. Die Plasmide wurden in 100 μ l Opti-MEM Medium (Invitrogen) gegeben und 8 μ l FuGene HD (Roche) zugegeben. Nach 48h wurden die Zellen mit 0,5ml 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert, dreimal mit 1ml PBS gewaschen und mit 100mM Glycin in PBS abgesättigt. Anschließend wurde für 8 min mit 0,1% Triton X in PBS permeabilisiert. Die verwendeten Primärantikörper sind jeweils gegen Flag bzw. Myc gerichtet (α -FLAG M2 aus Maus oder α - c-Myc aus Kaninchen, jeweils von Sigma-Aldrich).

Vor Zugabe des ersten Primärantikörpers wurde 20 min mit einer Blockinglösung inkubiert (5%-BSA in 1x PBS). Der erste Primärantikörper wurde für 1h auf den Zellen inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen und vor Zugabe von Alexa Fluor® Farbstoffen (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG, jeweils von Invitrogen) wurde wiederum für 20 min in Blockinglösung inkubiert. Die Fluoreszenz-Farbstoffe wurden in Blockinglösung verdünnt und für 45 min unter Lichtausschluss auf den

Zellen inkubiert. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit 1x PBS gewaschen und der zweite Primärantikörper wurde nach Blocken zugegeben. Nach der Färbung mit dem zweiten Fluoreszenz-Farbstoff wurde mit Hoechst (Nr. 33258, Invitrogen) Nukleotid Marker für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Objektträger wurden in Mowiol (Carl Roth) eingebettet und 24h unter Lichtausschluss bei 4°C ausgehärtet.

Mittels Mikroskopie wurde anschließend die subzelluläre Lokalisation der Proteine anhand des co-exprimierten Kontrollproteins (VKORC1) analysiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Gesamt-Proteinbestimmung erfolgte mittels Verwendung des DC Protein Assay Kit von Bio-Rad. Dieses Kit beruht auf dem Lowry-Test, bei dem Cu^+ -Ionen aus der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen instabilen blauen Komplex bilden, der als Maß der Proteinkonzentration dient. Es wurde nach beiliegendem Protokoll von Bio-Rad gearbeitet. Als Referenz wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 750nm am NanoPhotometer von IMPLEN.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Page werden Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wird das monomere Acrylamid durch die Radikalstarter Ammoniumperoxosulfat (APS) und Tetramethylethyldiamid (TEMED) zu Polyacrylamid polymerisiert. Die nichtkovalenten Proteinwechselwirkungen werden durch Behandlung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört und mittels Dithiothreitol (DTT) oder Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Das Laufverhalten der Proteine ist daher nur durch seine Masse bestimmt, da ungefähr ein SDS-Anion zwei Aminosäuren bindet und die negative Ladung, die das Protein dadurch erhält, größer ist als seine Eigenladung. Für die SDS-Page wurden lysierten Pellets von transfizierten Zellen benutzt.

Für die Auftrennung wurde das NuPAGE System der Firma Invitrogen verwendet. Es wurde nach beiliegendem Protokoll mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese gearbeitet.

Standardmäßig wurde ein 4-12%iges NuPAGE Gradienten- Polyacrylamid-Gel mit einem MES SDS-Laufpuffer verwendet. Da die Lysate zuvor mit dem Detergenz CHAPS behandelt wurden, wurde in die innere Kammer zusätzlich 500 µl Antioxidant zugegeben. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch bei einer Stromstärke von 200V pro Gel für ca. 30 min.

Zur Probenvorbereitung wurden 10 µg Protein mit 2,5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) und 1 µl NuPAGE Reducing Agent (10x), welches DTT enthält, gemischt. Die Probe wurde mit destilliertem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 10 min auf 70 °C erhitzt, wodurch die Spaltung der nichtkovalenten Bindungen durch SDS erleichtert wird und sich das Protein entfaltet. Als Protein Größen-Standard wurde 8µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standards von Bio-Rad verwendet.

2.4.3 Western Blot

Bei dem Western-Blot werden Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die hier verwendeten Nitrocellulosemembranen binden Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Durch die anschließende Immundetektion (siehe Abschnitt 2.4.5) können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. So erhält man unter anderem Informationen über die Größe, die Reinheit und die Expressionsmenge eines Proteins.

Für das Blotting der Proteine auf eine 0,4µm Nitrocellulosemembran wurde der Semi-Dry-Blotter PEGASUS (PHASE) verwendet. Die verwendeten Whatman-Papiere und die Nitrocellulosemembran wurden zuvor mit Blot-Puffer getränkt.

Blot-Puffer 1x NuPAGE Transfer Buffer
0,1% NuPage Antioxidant
10% Methanol
ad. ddH₂O

Die Proben wurden 30 min bei 200 mA/Gel (7 x 8cm) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Membran wurde anschließend entweder zwischen Whatman-Papieren getrocknet oder für die folgende Immundetektion 1h in Blockpuffer inkubiert. Durch den Blockpuffer werden unspezifische Proteinbindungsstellen zum Beispiel mit BSA, entfettetem Milchpulver (Blotto) oder Tween 20 abgesättigt.

Blockpuffer 1x PBS
 0,05% Tween 20
 3% Blotto

2.4.4 Immundetektion

Bei der Immundetektion färbt man Antigene, welche an eine Nitrozellulosemembran gebunden sind, mit Antikörpern. Nach dem Absättigen unspezifischer Bindungen mit Blockinglösung wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer anti-Antigen-Antikörper Lösung schüttelnd inkubiert (1. Antikörper, Verdünnung in Blockpuffer siehe Tabelle 4). Am nächsten Tag wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, für 1h bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper, einem markierten Antikörper, der den 1. Antikörper bindet, inkubiert und anschließend wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Waschpuffer (PBST): 1x PBS
 0,05% Tween 20

PRIMÄRER ANTIKÖRPER von Sigma-Aldrich	Verdünnung in Blockpuffer
ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse	1:1000
ANTI-c-MYC antibody produced in rabbit	1:500
SEKUNDÄRER ANTIKÖRPER von Dianova	Verdünnung in Waschpuffer
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat anti-Mouse IgG	1:5000
Peroxidase-conjugated AffinPure Goat anti-rabbit IgG	1:5000

Tabelle 4: **verwendete Antikörper**

Da Milchpulverlösungen schnell von Bakterien befallen werden, wurde zu der Primärantikörperlösung 0,02% Natriumazid (NaN_3) zugegeben und bei -20°C gelagert. Die Primärantikörper wurden fünfmal verwendet.

Der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper wurde mittels ECL-Reaktion nachgewiesen. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemilumineszenz aus, das dabei entstandene Licht wurde über einen Röntgen-Film gemessen. Für die ECL-Reaktion wurde der Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents Kit von GE Healthcare Life Science verwendet. Es wurde nach beiliegendem Protokoll gearbeitet.

2.4.5 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation (IP) ist eine Technik, die zum Bestätigen von Protein-Interaktionen verwendet werden kann. Hierbei wird ein bestimmtes Antigen, aus der Vielzahl der Antigene einer Lösung, durch Bindung an Antikörper-gekoppelte Protein A- oder Protein G-Agarose isoliert [204-206]. Im Präzipitat wird das Antigen über das Molekulargewicht in der SDS-Gelelektrophorese bestimmt (vgl. Abschnitt 2.4.2).

Die Frage nach der Interaktion von VKORC1 mit 5 verschiedenen Proteinen bzw. sich selbst wurde mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht. Hierfür wurde VKORC1 mittels Klonierungs-PCR C-terminal Flag getaggt (DYKDDDDK) und in den pcDNA3.1(+)-Vektor kloniert. Die Interaktionskandidaten wurden in den pcDNA3.1(+)-MycHis(B)-Vektor kloniert. Zu deren Nachweis wurde das N-terminale Myc-Tag (EQKLISEEDL) verwendet.

Der komplette Versuch wurde auf Eis in vorgekühlten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden insgesamt 10µg der Plasmide in HEK 293 EBNA Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.3.5) und für 48h exprimiert. Das Zellpellet einer 10cm Zellkulturschale wurde dreimal mit 1ml 1x PBS gewaschen und in 200µl Lysepuffer (20mM MES, 30mM Tris, 100mM NaCl, 15 Triton X-100, 20mM NEM, 1mM PMSF, pH 7,4) 30 min auf Eis lysiert [75]. Das Lysat wurde 30 min bei 12.000rpm und 4°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, bestimmt. 1mg des Lysats wurde durch Inkubation mit 80µl Sepharose CL-6B (Sigma Aldrich) für 1h bei 4°C rotierend gereinigt. Hierzu wurde das Volumen auf 500µl mit Inkubationspuffer (20mM Mes, 30mM Tris, 100mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF, pH 7,4) aufgefüllt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 16.000rpm und 4°C pelletiert. 200µl des gereinigten Überstandes wurden daraufhin auf 40µl Antikörper gekoppelte Agarose gegeben und 2h bei 4°C über Kopf rotiert. Es wurde mit Anti-C-Myc Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) oder mit Flag M2 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich) gearbeitet. Die an die Agarose gebundenen Proteine 30sek bei 5000g und 4°C abzentrifugiert und achtmal mit 1ml 1x PBS durch invertieren gewaschen. Nach jedem Waschschriff wurde 30sek bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Agarose-Kügelchen in ein neues Cap überführt und der Überstand sehr gut abgenommen.

Zur Analyse der IP wurde 10µl NuPage LDS Buffer (4x) und 4µl NuPage Reducing Agent zu der Agarose gegeben (Invitrogen), so dass ca. ein Endvolumen von 40µl entstand. Das Eluat wurde für 10 min bei 70°C und 2 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Abschnitt 2.4.2). Entwickelt wurden die Blots, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben, entweder mit rabbit polyclonal anti-c-Myc antibody (Sigma-Aldrich) oder mouse monoclonal anti-Flag M2 antibody. Der Sekundär-Antikörper war entweder anti-mouse HRP (HRP= konjugiert mit horseradish peroxidase) oder anti-rabbit HRP (jeweils von Dianova).

2.4.6 Split-Ubiquitin-System

Das Interaktionsscreening mittels Split-Ubiquitin-System (siehe Abschnitt 1.6.1) wurde mit dem DUALmembrane Kit 3 (Protokoll P01001-G06, Stand 15.10.2007) von Dualsystems Biotech AG, Schweiz (<http://www.dualsystems.com/protein-interaction-discovery/dualmembrane-services.html>) durchgeführt.

Die Plasmidisolierung und Sequenzierung wurde, wie in Kapitel 2.2.5 bzw. 2.2.7.1, beschrieben durchgeführt.

Da das Split-Ubiquitin-System auf der Reorganisation des N- und C-terminalen Ubiquitin Fragmentes basiert, ist die Wahl des richtigen „Köder“-Expressionsvektors entscheidend. Der Vektor richtet sich nach der Topologie des jeweiligen Proteins. Hierfür unterscheidet man verschiedene Membranproteintypen. Typ 1 ist dadurch charakterisiert, dass das C-terminale Ende in das Zytoplasma reicht, während das N-terminale Ende ins Lumen zeigt. Wichtig hierbei ist auch die Einschränkung, dass Typ 1 Proteine nur eine Transmembrandomäne besitzen dürfen.

Zu den Typ 2 integralen Membranproteinen gehören die Proteine, bei denen das N-terminale Ende ins Zytoplasma zeigt, während das C-terminale ins Zytoplasma oder Lumen gerichtet sein kann. Die Anzahl der Transmembran-Domänen ist hierbei flexibel. Proteine, bei denen beide Enden ins Lumen gerichtet sind, können im DUALmembran System nicht untersucht werden.

Da beide VKOR-Proteine, VKORC1 und VKORC1L1 strukturell zu den Typ 2 Membran-Proteinen zählen, bei denen das C- und N-terminale Ende ins Zytoplasma zeigt, wurde der Vektor pBT3-STE als Expressionsvektor gewählt. Bei diesem Vektor fusioniert der N-Terminus mit einer STE2-Sequenz, die die Translation des Proteins verbessert und der C-Terminus mit einem Cub-LexA-VP16. Hierfür wurde VKORC1 als auch VKORC1L1 mittels Klonierungsprimern (siehe Tabelle 1) mit einer SfiI Schnittstelle versehen und später mithilfe

dieser Schnittstelle in den pBT3-STE Vektor kloniert. Das Stopcodon wurde jeweils mithilfe der Klonierungsprimer durch ein Glycin ersetzt.

Die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) wurde in zwei unterschiedliche Expressionsvektoren mit Hilfe der *SfiI*-Schnittstelle kloniert (pBT3-STE und pBT3-N). Bei der Vitamin K-abhängigen γ -Glutamyl-Carboxylase handelt es sich um ein 87,5 kDa großes Membranprotein des Endoplasmatischen Reticulums (ER). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass GGCX fünf Transmembrandomänen aufweist. Der N-Terminus zeigt in das Zytoplasma während der C-Terminus mit einer großen hydrophilen Domäne in das Lumen des ERs zeigt (siehe Abbildung 7).

Diese Konstrukte wurden für den Interaktionsscreen verwendet. Die cDNA-Klonbank wurde von Dualsystem Biotech AG produziert. Hierbei richtete sich der cDNA-Expressionsvektor („Beute“-Vektor z.B. pBR-N oder pBR-STE) nach dem „Köder“- Vektor z.B. pBT-N oder pBT-STE).

3. ERGEBNISSE

3.1 VKORC1L1 - Kinetik

Über die physiologische Rolle von VKORC1L1 war zu Beginn der Arbeit soweit nichts bekannt. Die hohe Homologie von VKORC1L1 zu VKORC1 legt allerdings nahe, dass VKORC1L1 eventuell ebenfalls als Oxido-Reduktase für das Vitamin K-2,3-Epoxid fungiert. Wenn dies der Fall ist, wäre es interessant, ob die Reduktion ebenfalls Coumarin-sensitiv ist.

Das Messprinzip für die Oxido-Reduktase-Aktivität beruht auf der Umsetzung von Vitamin K-Epoxids zu Vitamin K-Chinon. Sowohl das Substrat als auch das Produkt können mittels eines Hochdruck-Flüssigchromatographie-Trennverfahren (HPLC) gemessen werden (siehe Abschnitt 2.3.7).

3.1.1 VKOR-Assay-Optimierung

Für die Messung der VKORC1L1-Aktivität wurde zuvor der VKOR-Assay bezüglich der Parameter pH, der Menge an Enzym und der CHAPS-Konzentration untersucht, um den Assay eventuell für die VKORC1L1 zu optimieren.

3.1.1.1 Chinon-Eichgerade

Um die HPLC-Daten auswerten zu können, wurde zuerst eine Chinon-Eichgerade erstellt, um das Reaktionsprodukt zu quantifizieren. Hierzu wurde bei einer bestimmten Chinon-Konzentration die Fläche des Peaks in der HPLC bestimmt. Die daraus resultierende lineare Gleichung $y = 0,0967x + 0,001$ für Vitamin K1-Chinon als Substrat wurde für die weiteren Messungen zur Quantifizierung der entsprechenden Chinonmenge genutzt (siehe Abbildung 12). Für Vitamin K2-Chinon als Substrat ergab sich folgende lineare Gleichung, $y = 0,0966x - 0,0017$, welche ebenfalls für die entsprechenden Messungen genutzt wurde (siehe Abbildung 13).

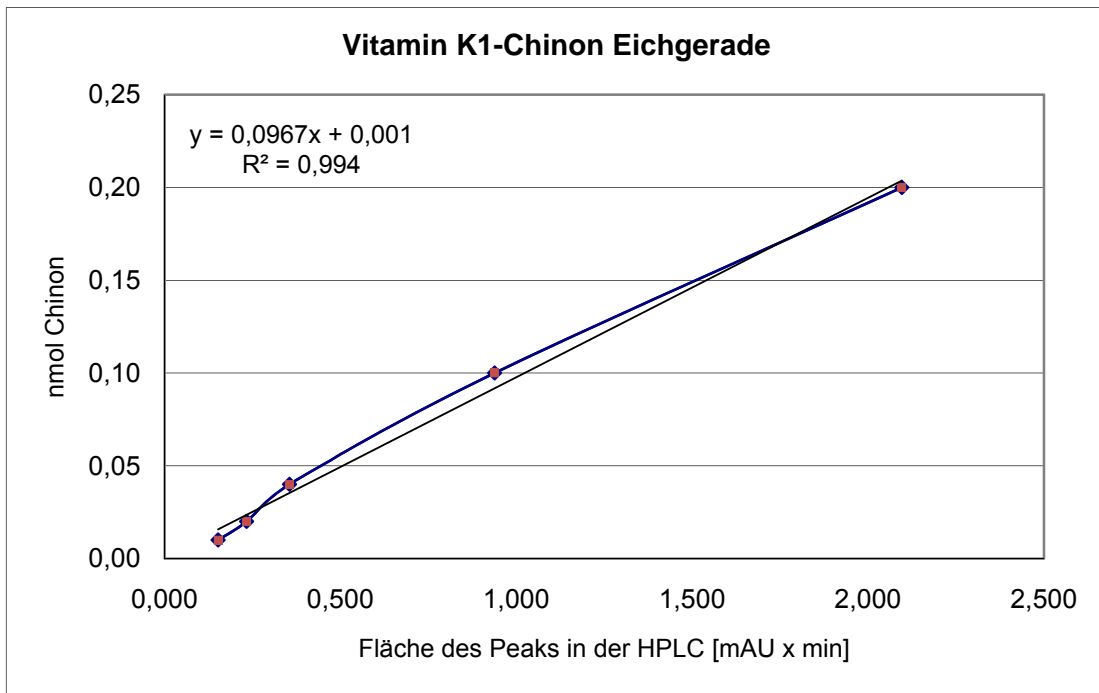


Abbildung 12: **Vitamin K1-Chinon Eichgerade.**

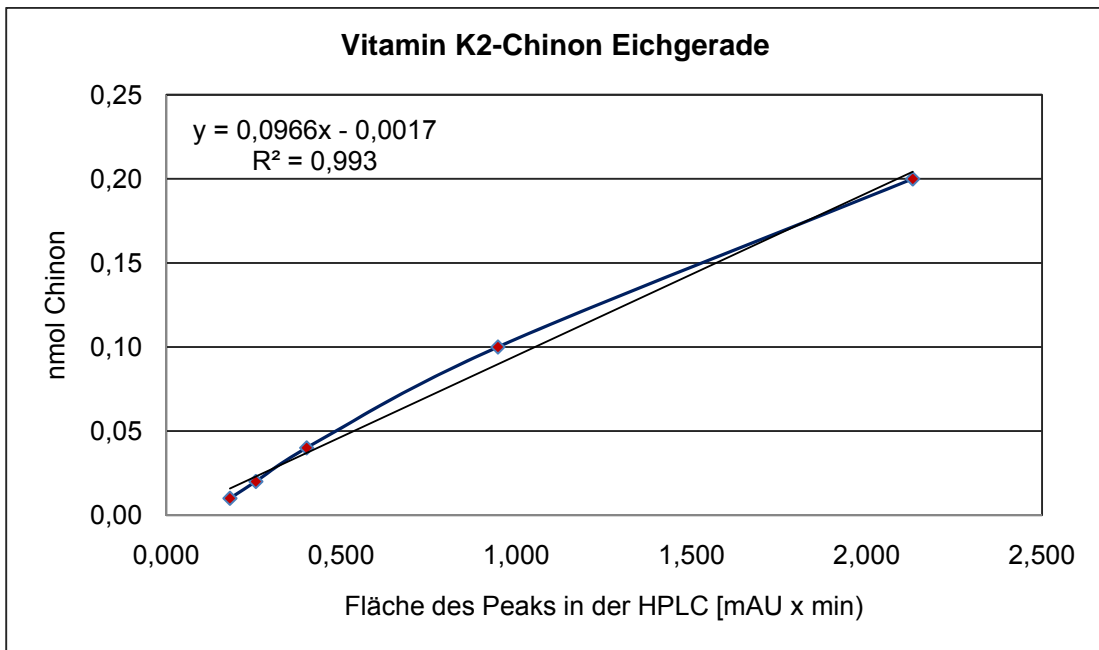


Abbildung 13: **Vitamin K2- Chinon Eichgerade.**

3.1.1.2 VKORC1L1-HEK-Lysat Konzentration

Der Standard-VKOR-Assay wurde mit unterschiedlichen Mengen von VKORC1L1-Lysaten aus HEK-Zellen durchgeführt, um die optimale Menge Lysat für den Assay zu bestimmen. Als Substrat diente jeweils 8 μ M VKO1 bzw. VKO2. In den Assay für die VKORC1-Aktivität wurden standardmäßig 30 μ l Zellhomogenat eingesetzt. Da aber schon mit einer Lysat-Menge von 10 μ l keine signifikante Steigung mehr bei VKO1 als Substrat und ein Aktivitätsrückgang bei VKO2 als Substrat feststellbar war, wurde für den Standard-Assay der VKORC1L1-Aktivität eine Konzentration von 10 μ l HEK-Zellhomogenat verwendet (siehe Abbildung 14).

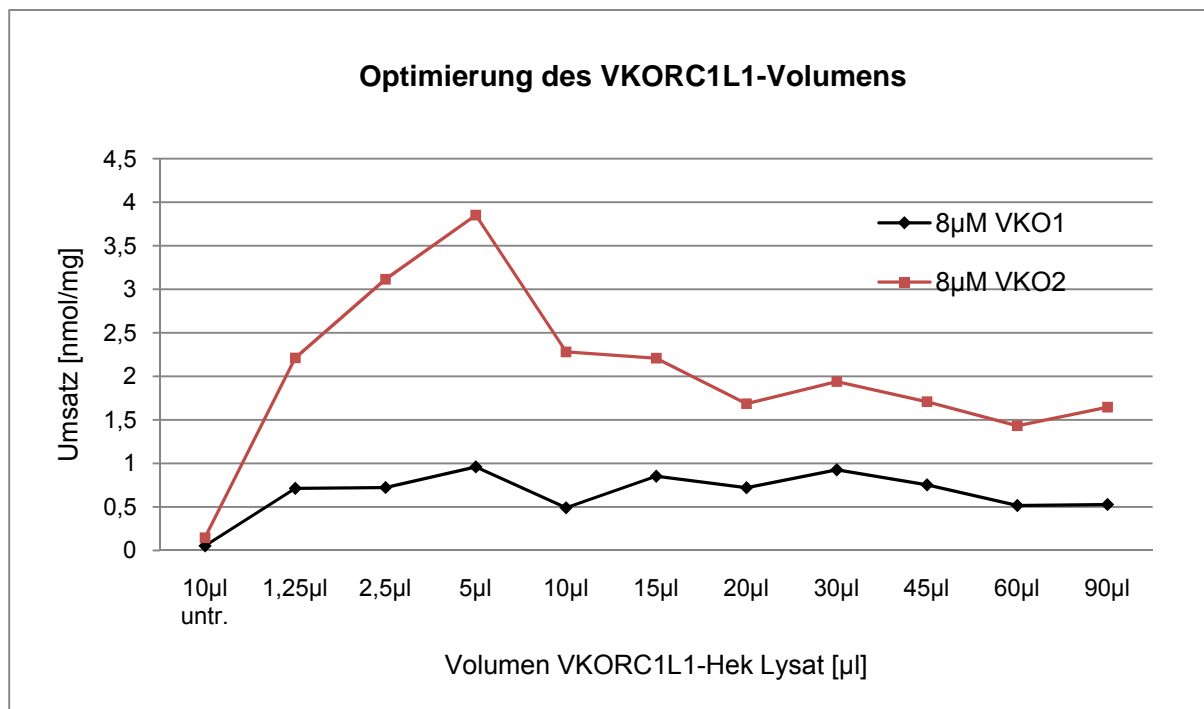


Abbildung 14: **Optimierung des VKORC1L1-Volumens.**

Es wurden unterschiedliche Volumina des Zellhomogenats in den VKOR-Assay (siehe Abschnitt 2.3.7) eingesetzt. Der Umsatz an Chinon [nmol] bezieht sich auf die Zellhomogenat Proteingehamtmenge [mg].

Die Aktivität von VKORC1L1 wurde immer auf die eingesetzte Proteingehamtmenge des Zellhomogenates berechnet, wodurch Schwankungen durch unterschiedlich starke Expression minimiert werden sollten. 10 μ l entsprechen in diesem Versuch ca. 0,07mg Zellhomogenat.

3.1.1.3 pH-Optimierung

Als Standardbedingung wird im VKORC1-Enzymassay ein Puffer mit einem pH=7,6 verwendet. Für die VKORC1L1-Aktivität wurden verschiedene pH-Werte im Assay getestet. Der Versuch lief unter Standardbedingungen (0,5 %, CHAPS, 5 mM DTT, 5 mM CaCl₂, 8 µM Vitamin K1-Epoxid, 10 µl HEK-Lysat; siehe Abschnitt 2.3.7).

Da höhere pH-Werte außerhalb des physiologischen Bereiches der Reaktion liegen bzw. im Assay mit steigendem pH-Wert der Umsatz auch ohne Enzym stark anstieg, wurde für alle weiteren Versuche ein pH=7,6 verwendet. (siehe Abbildung 15). Hinzu kommt, dass dadurch der Vergleich zu vorliegenden Daten des VKORC1-Proteins möglich ist, da die Kinetik von VKORC1 ebenfalls mit einem pH von 7,6 durchgeführt wurde.

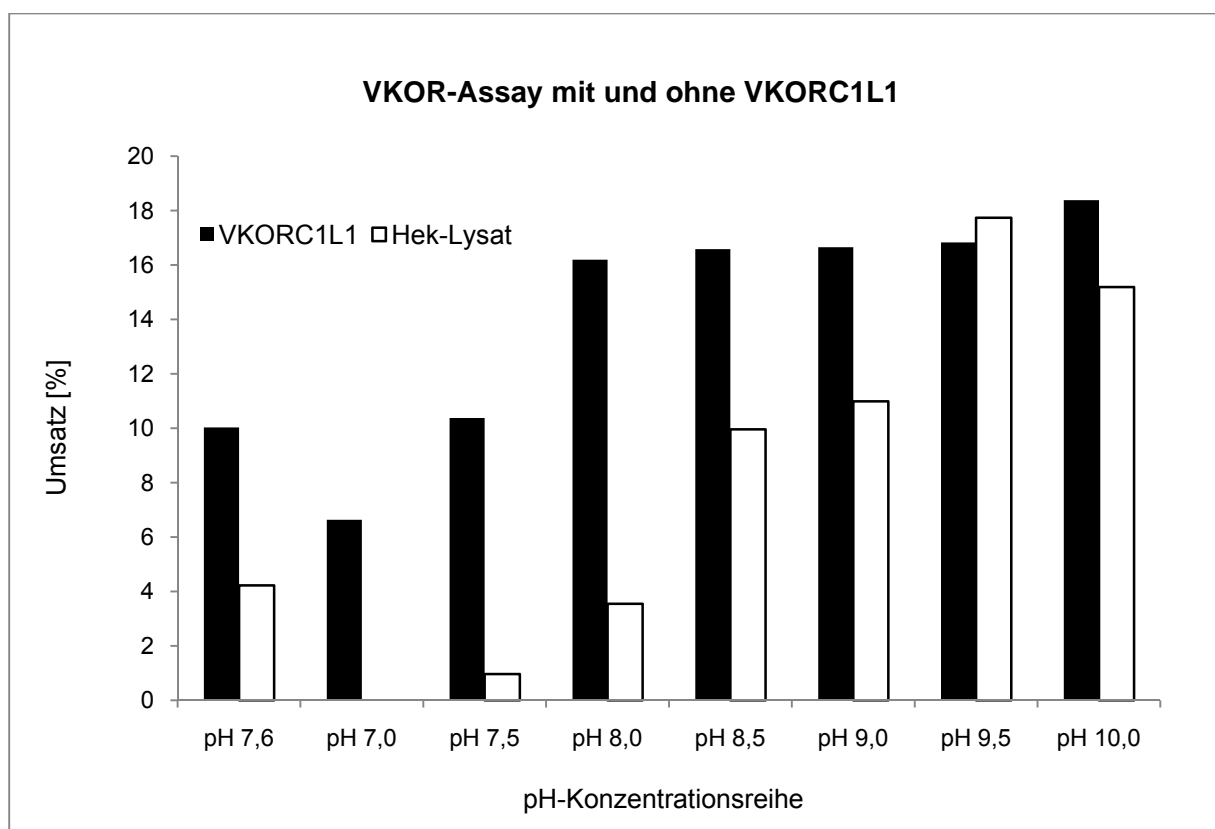


Abbildung 15: **VKOR-Enzymassay bei unterschiedlichen pH-Werten.**

In blau ist der Umsatz an Vitamin K1-Chinon in % angezeigt und in rot der Umsatz von nicht transfizierten HEK-Zelllysate.

3.1.1.4 CHAPS-Konzentration Optimierung

Im den VKORC1-Enzymassay werden 0,5 % CHAPS als Detergenz für die membranständige VKOR eingesetzt. Die optimale CHAPS-Konzentration für VKORC1L1 wurde durch eine CHAPS Konzentrationsreihe von 0,02-2,00% ermittelt. Ansonsten wurden Standardbedingungen, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, verwendet (pH 7,6; 5 mM DTT; 5 mM CaCl₂; 8 µM Vitamin K1-Epoxid; 10 µl HEK-Homogenat).

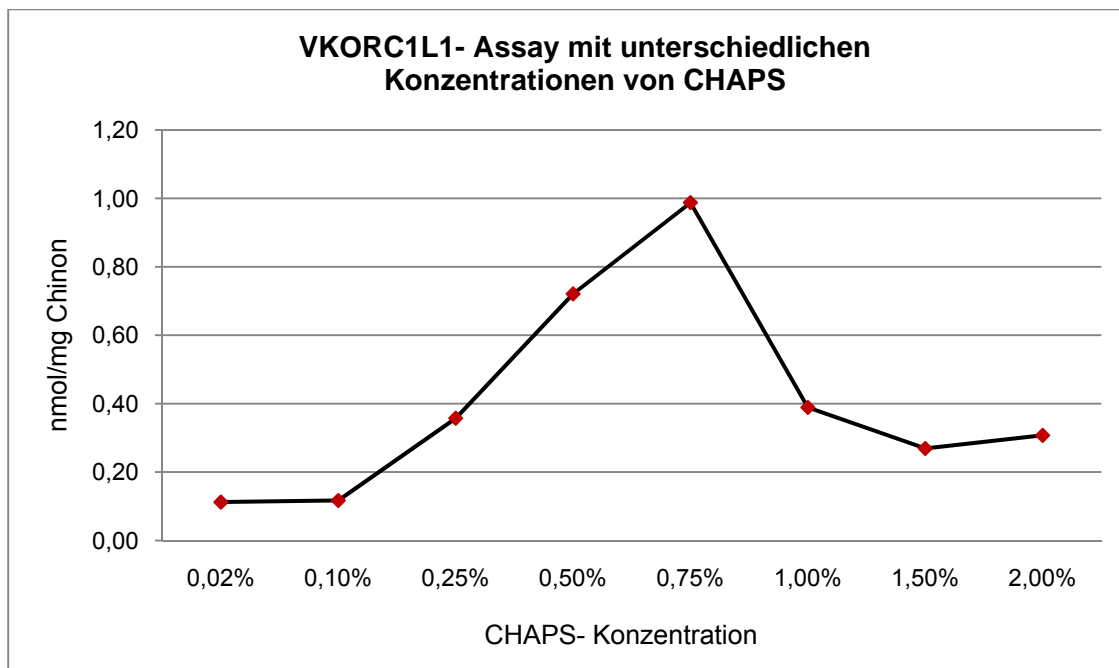


Abbildung 16: **VKORC1L1-Assay mit unterschiedlichen Konzentrationen an CHAPS.**

Die VKORC1L1-Aktivität steigt ab einer CHAPS-Konzentration von 0,1% an und fällt ab 0,75% wieder ab, daher und um die Vergleichbarkeit mit parallel laufenden VKORC1-Messungen zu erhalten, wurde eine Konzentration von 0,5% für folgende Versuche verwendet.

Das Aktivitätsmaximum wurde bei 0,75% CHAPS erreicht, wobei die Aktivität kurz darauf stark abfiel (siehe Abbildung 16). Es wurde daher, adäquat zu dem VKORC1-Assay, eine CHAPS-Konzentration von 0,5 % für weitere Versuche verwendet um wiederum ebenfalls die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.1.2 Michaelis-Menten Kinetik

Nachdem gezeigt werden konnte, dass VKORC1L1 ebenfalls die Reduktion von Vitamin K-Epoxid katalysieren kann, sollte nun durch die Bestimmung von V_{MAX} und K_M VKORC1L1 enzymatisch charakterisiert werden.

Das Michaelis-Menten Modell postuliert einen generellen Mechanismus für enzymatisch katalysierte Reaktionen. Es besagt, dass ein Enzym zuerst reversibel an sein Substrat bindet und dadurch ein Enzym-Substrat-Komplex entsteht. Nach Umwandlung des Substrates zerfällt der Komplex in freies Enzym und das Reaktionsprodukt. Die Michaelis-Menten Kinetik liefert mit folgender Formel $v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$ die mathematische Beschreibung dessen und damit eine quantitative Beschreibung von Enzym-Substrat-Reaktionen. Hierbei ist V_0 die initiale Reaktionsgeschwindigkeit; $[S]$ die Substratkonzentration und V_{MAX} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Michaelis-Menten Konstante K_M dient als ein Maß für die Stabilität eines Enzym-Substrat-Komplexes. Je kleiner die K_M ist, desto größer ist die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes und desto stabiler ist er. Auf der anderen Seite je größer die K_M , desto instabiler ist er.

Weiterhin ist die Michaelis-Menten-Konstante auch ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat, da sie die Substratkonzentration angibt, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Eine hohe K_M bedeutet eine geringe Affinität des Enzyms zum Substrat. Dann kann erst bei einer relativ hohen Substratkonzentration die Halbsättigung erreicht werden. Ein niedriger K_M -Wert zeigt dementsprechend eine hohe Enzym-Substrat-Affinität an, d.h. es ist wenig Substrat zur Sättigung nötig.

Über die Michaelis-Menten-Gleichung kann auch eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit getroffen werden, da $K_M = \frac{1}{2} V_{MAX}$, also der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit ist. Bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{MAX} , kann durch Zugabe von Substrat keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden, was bedeutet, dass alle Bindungsstellen des Enzyms mit Substrat gesättigt sind.

K_M und V_{MAX} der VKORC1L1 wurde mit Hilfe des Programms OriginPro berechnet. So konnte für Vitamin K1-Epoxid als Substrat ein K_M -Wert von $0,787 \pm 0,062 \mu\text{M}$ und ein V_{MAX} von 2,933

$\pm 0,037$ nmol/mg protein/min ermittelt werden (siehe Abbildung 17), während Messungen mit Vitamin K2-Epoxid einen K_M von $0,473 \pm 0,064$ μ M und einen V_{MAX} von $7,182 \pm 0,473$ nmol/mg protein/min ergaben (siehe Abbildung 18).

Aufgrund der niedrigeren K_M kann davon ausgegangen werden, dass Vitamin K2-Epoxid eine stärkere Affinität zu VKORC1L1 hat als Vitamin K1-Epoxid und dass die Sättigung mit K2-Epoxid schneller erreicht ist als mit K1-Epoxid. (siehe Abbildung 19). Der 2,4 fach höhere V_{MAX} zeigt eine schnellere Verstoffwechslung von Vitamin K2 Epoxid im Vergleich zu Vitamin K1 Epoxid an (siehe Abbildung 19).

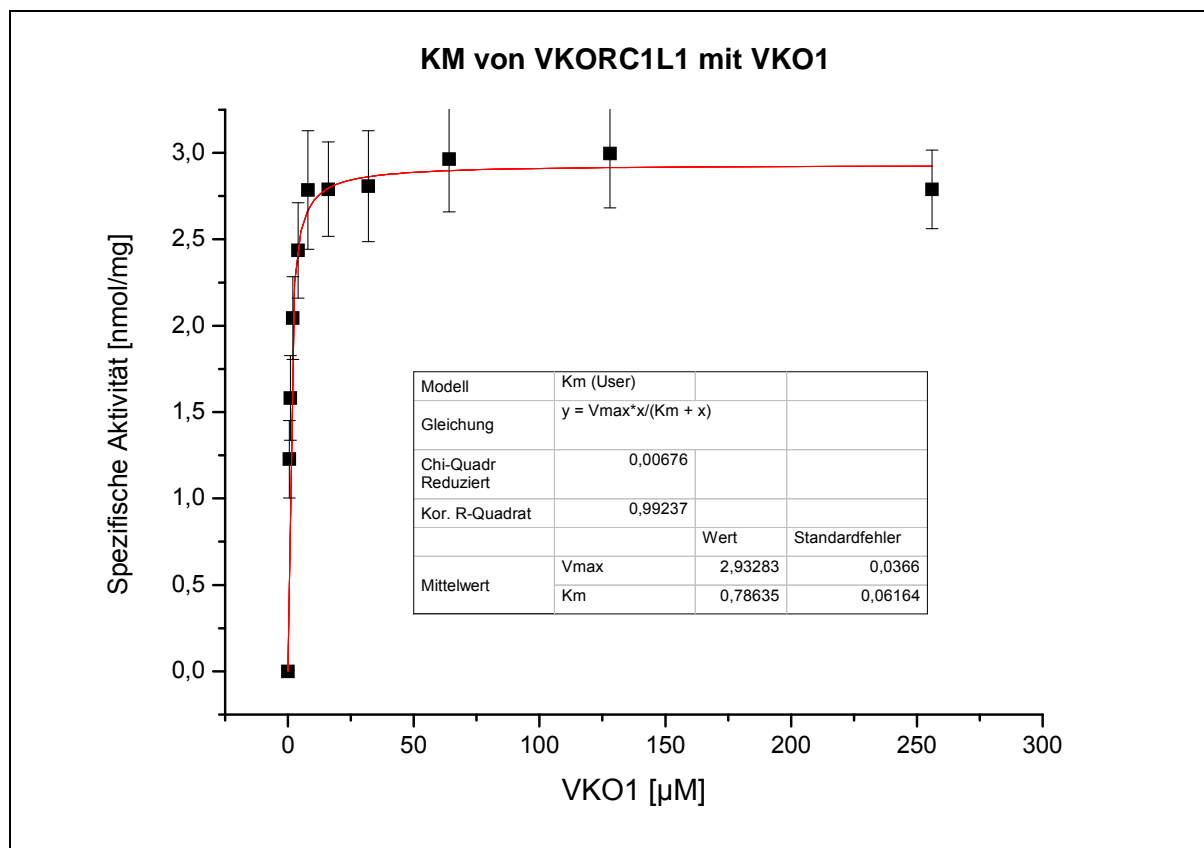


Abbildung 17: **Kinetik von VKORC1L1 mit Vitamin K1-Chinon als Substrat.**

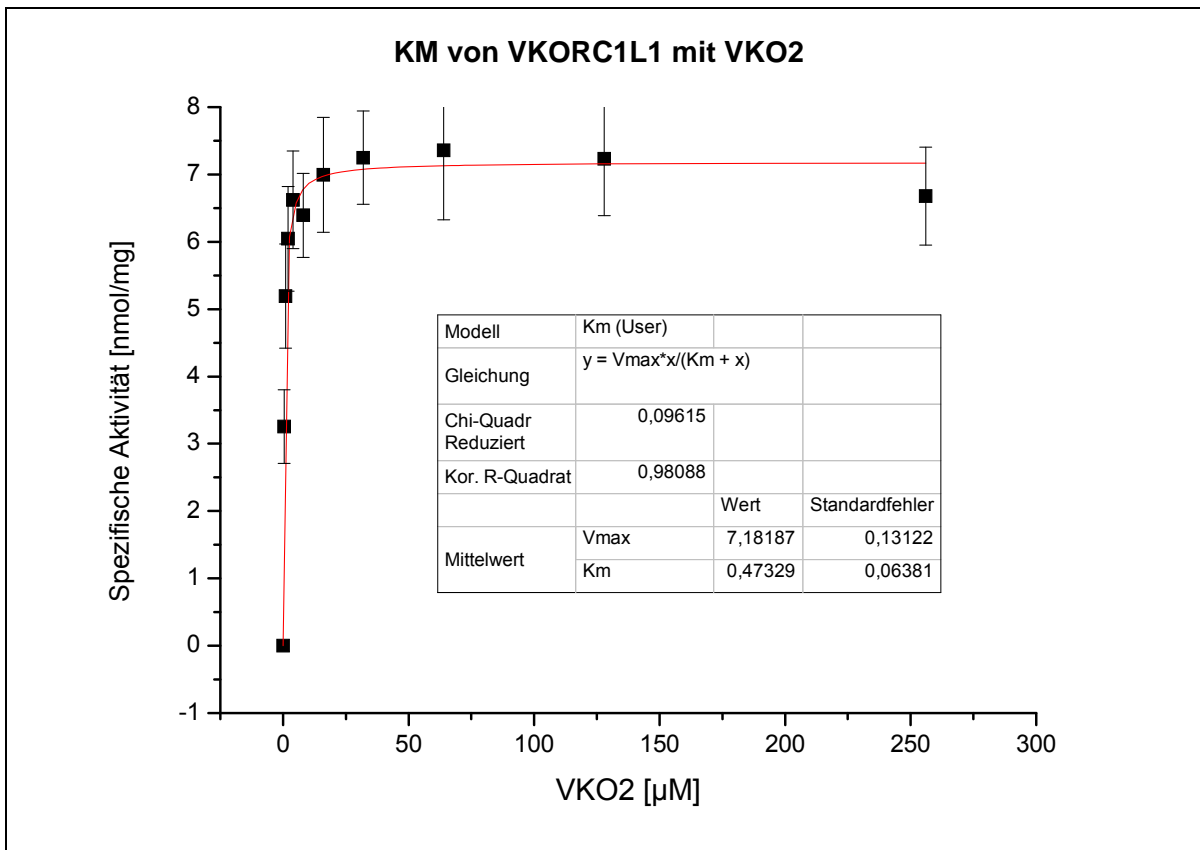


Abbildung 18: Kinetik von VKORC1L1 mit Vitamin K2-Chinon als Substrat.

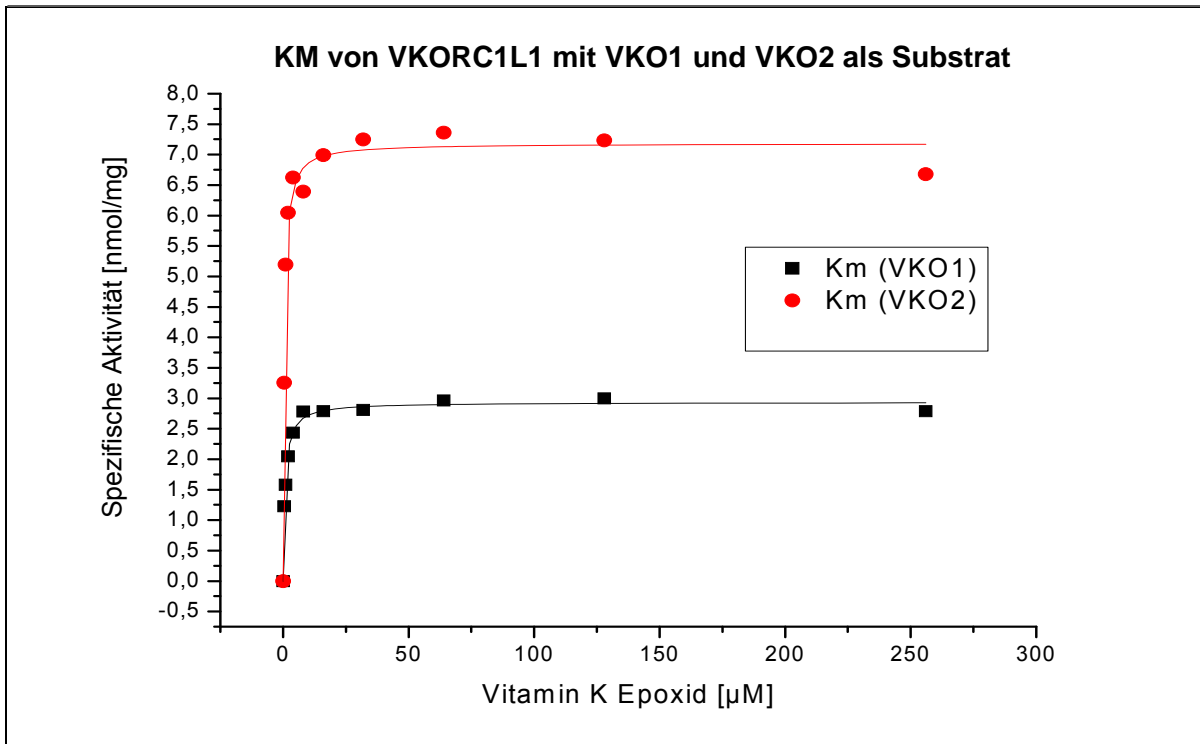


Abbildung 19: Vergleich der Kinetik mit den Substraten VKO1 und VKO2.

3.1.3 Vitamin K₁ und K₂-Epoxid als konkurrierende Substrate

Vitamin K₁- und K₂-Epoxid sind beide Substrate der VKORC1L1. Wenn beide Substrate konkurrierend in den Standard- VKOR-Assay eingesetzt werden (Abbildung 20), wird deutlich, dass VKO₂ bevorzugt verstoffwechselt wird. Gibt man die gleiche Menge VKO₁ und VKO₂ in den Assay, wird VKO₂ viermal stärker umgesetzt. Bei einem Verhältnis von 30 zu 70 % von VKO₁ zu VKO₂ ist der Umsatz gleich.

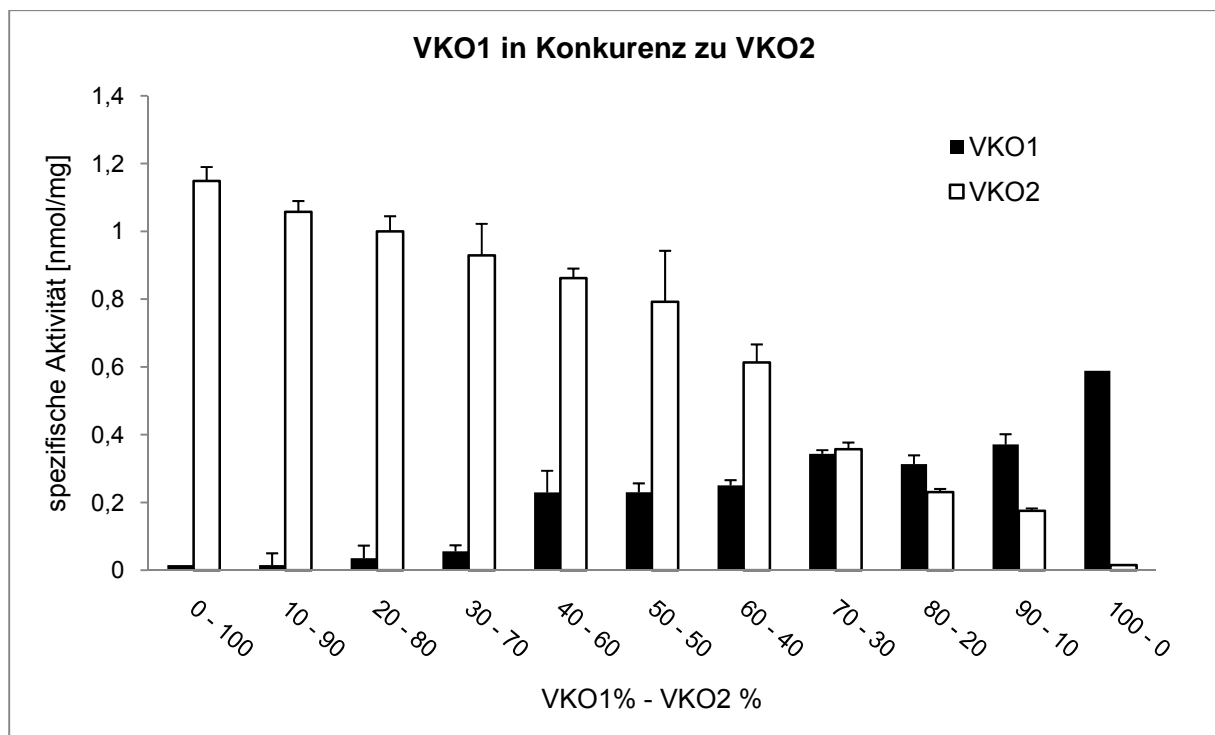


Abbildung 20: **VKO1 in Konkurrenz zu VKO2.**

VKO₁ (blau) wird deutlich schwächer von VKORC1L1 verstoffwechselt wie VKO₂ (rot).

3.1.4 Hemmstudien von VKORC₁L₁ mit Warfarin

Da die Reduktase-Eigenschaft von VKORC₁ durch Coumarin-Derivate wie Warfarin gehemmt werden kann, wurde weiterhin die Wirkung von Warfarin auf VKORC₁L₁ untersucht.

Um die Zeitabhängigkeit der Hemmung zu untersuchen, wurde ein Inhibitortest durchgeführt, bei dem die Inkubationszeit variiert: 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20; 30 und 60 min (siehe Abbildung 21).

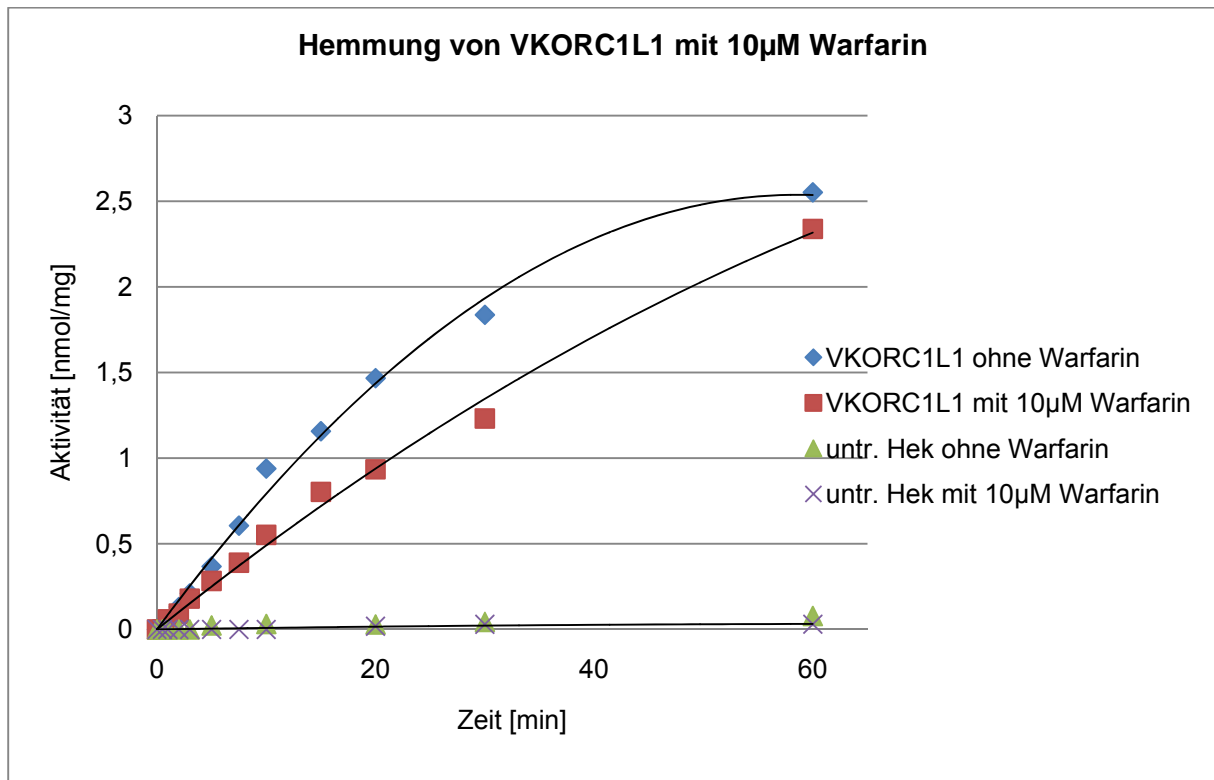


Abbildung 21: **Zeitabhängigkeit der VKORC1L1- Aktivität mit und ohne Hemmung durch 10 μ M Warfarin.**

Als Substrat diente Vitamin K 2-Epoxid. Die Reaktion wurde nach 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15; 20; 30 und 60 min gestoppt. Der Umsatz nimmt sowohl mit und ohne Hemmung zu.

Aus der Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung, können Rückschlüsse gezogen werden, ob reversible oder irreversible Hemmung vorliegt. Die Ergebnisse deuteten auf eine reversible Hemmung durch Warfarin hin, da die Hemmwirkung, im Vergleich zu der nicht gehemmten Kontrolle, bei steigender Inkubationszeit nicht signifikant zunahm. Die Inkubationszeit hat keinen Einfluss auf das $ES \leftrightarrow EI$ – Gleichgewicht, d.h. die Dauer der Inkubation ist ohne Bedeutung für die Hemmung.

Um die Empfindlichkeit der Warfarin-Hemmung zu untersuchen, wurden in den VKOR-Assay (siehe Abschnitt 2.3.7) vor der Zugabe von 8 μ M Vitamin K-Epoxid die Warfarin-Konzentration variiert (siehe Abschnitt 2.3.8.2). Um den IC_{50} -Wert zu bestimmen, müsste der Versuchsaufbau mit weitaus weniger Vitamin K-Epoxid durchgeführt werden, da die Substratmenge hierfür dem K_M entsprechen sollte. Wenn jedoch nur 0,8 μ M VKO1 bzw. 0,5 μ M VKO2 als Substrat eingesetzt wurden, konnten keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden, da die Aktivität selbst bei minimale Mengen Warfarin nicht mehr messbar waren.

Wie in Abbildung 22 und 23 zu sehen, kann die VKORC1L1-Aktivität, sowohl bei VKO1 wie auch bei VKO2 als Substrat, durch Warfarin gehemmt werden. Abbildung 24 zeigt, wie bereits in Abschnitt 3.1.2 aufgeführt, dass die Ausgangsaktivität von Vitamin K2-Epoxid als Substrat höher ist als bei Vitamin K1-Epoxid.

Der IC_{50} -Wert, der die Konzentration an Inhibitor angibt, bei der eine 50%ige Hemmung vorliegt, kann nur berechnet werden, wenn die eingesetzte Substratmenge gleich dem K_M ist. Eine 50 %ige Hemmung von VKORC1L1 konnte bei VKO1 als Substrat ca. 20,20 μM Warfarin erzielt werden (siehe Abbildung 22).

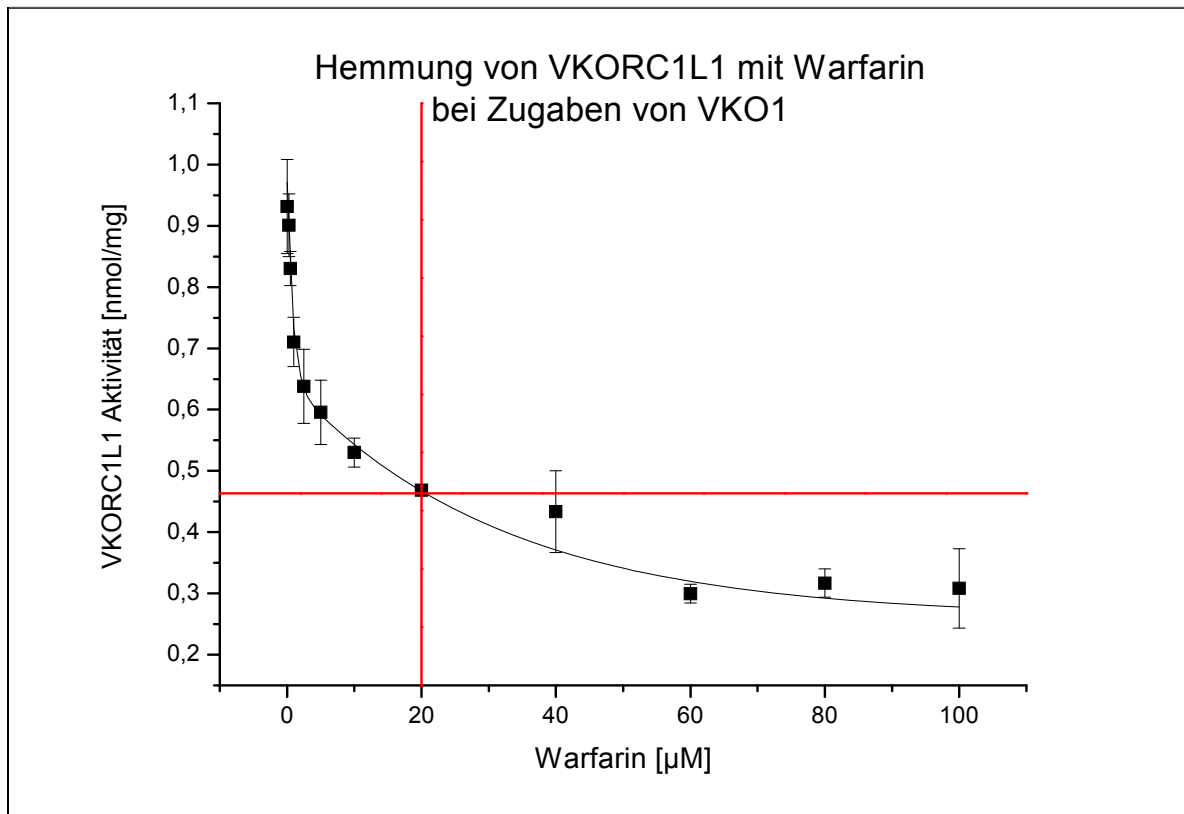


Abbildung 22: **Hemmung der VKORC1L1 durch unterschiedliche Warfarin Konzentrationen mit VKO1 als Substrat.**

In den Standardassay wurden 0, 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80 und 100 μM Warfarin in DMSO eingesetzt. Als Substrat diente 8 μM Vitamin K1-Epoxid.

Bei VKO2 als Substrat konnte eine 50 %ige Hemmung von VKORC1L1 bereits bei ca. 4,06 μM Warfarin erzielt werden (siehe Abbildung 23).

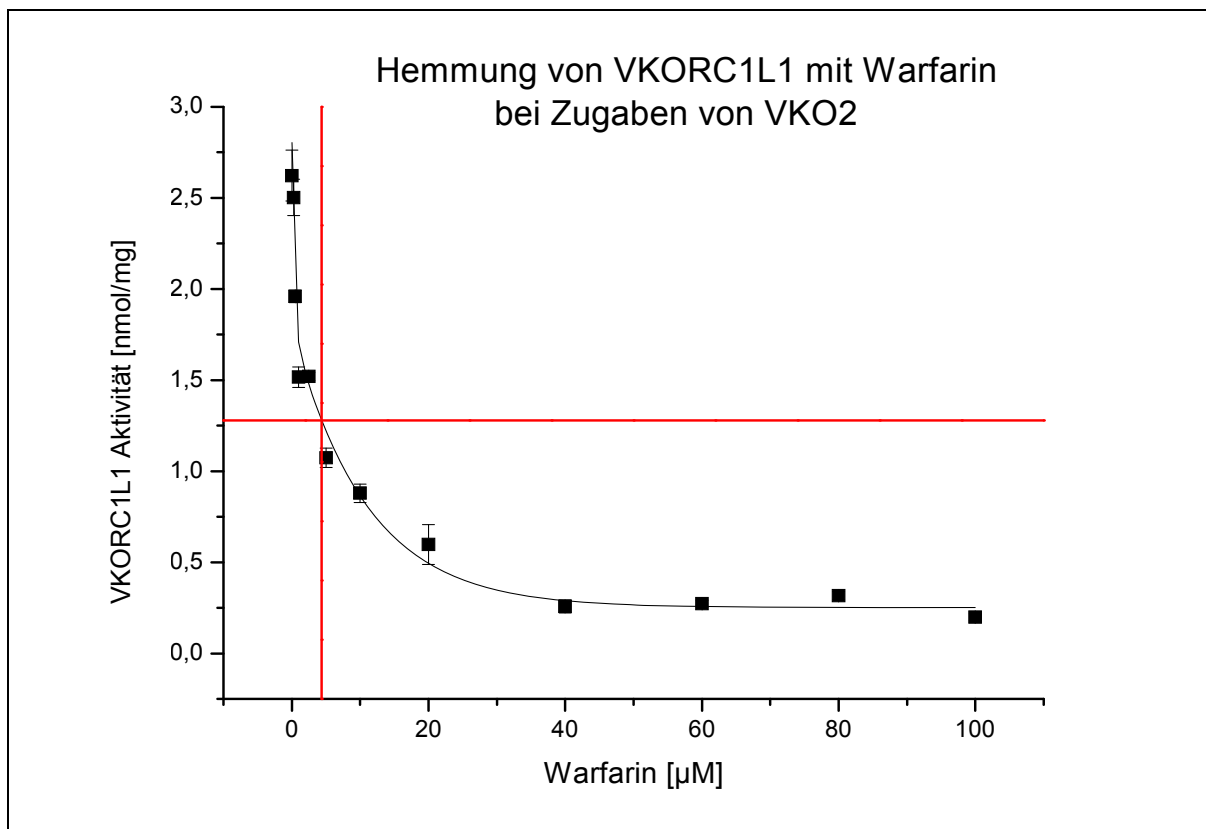


Abbildung 23: **Hemmung der VKORC1L1 durch unterschiedliche Warfarin Konzentrationen mit VKO2 als Substrat.**

In den Standardassay wurden 0, 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80 und 100 μM Warfarin in DMSO eingesetzt. Als Substrat diente 8 μM Vitamin K2-Epoxid.

In der Überlagerung der beiden Kurven (Abbildung 24) erkennt man, dass durch Zugabe von ca. 40 μM Warfarin (beachte SE von VKO1 in Abbildung 22) *in vitro* die VKORC1L1-Aktivität, sowohl bei 8 μM VKO1 wie auch bei 8 μM VKO2 als Substrat fast vollständig gehemmt wird.

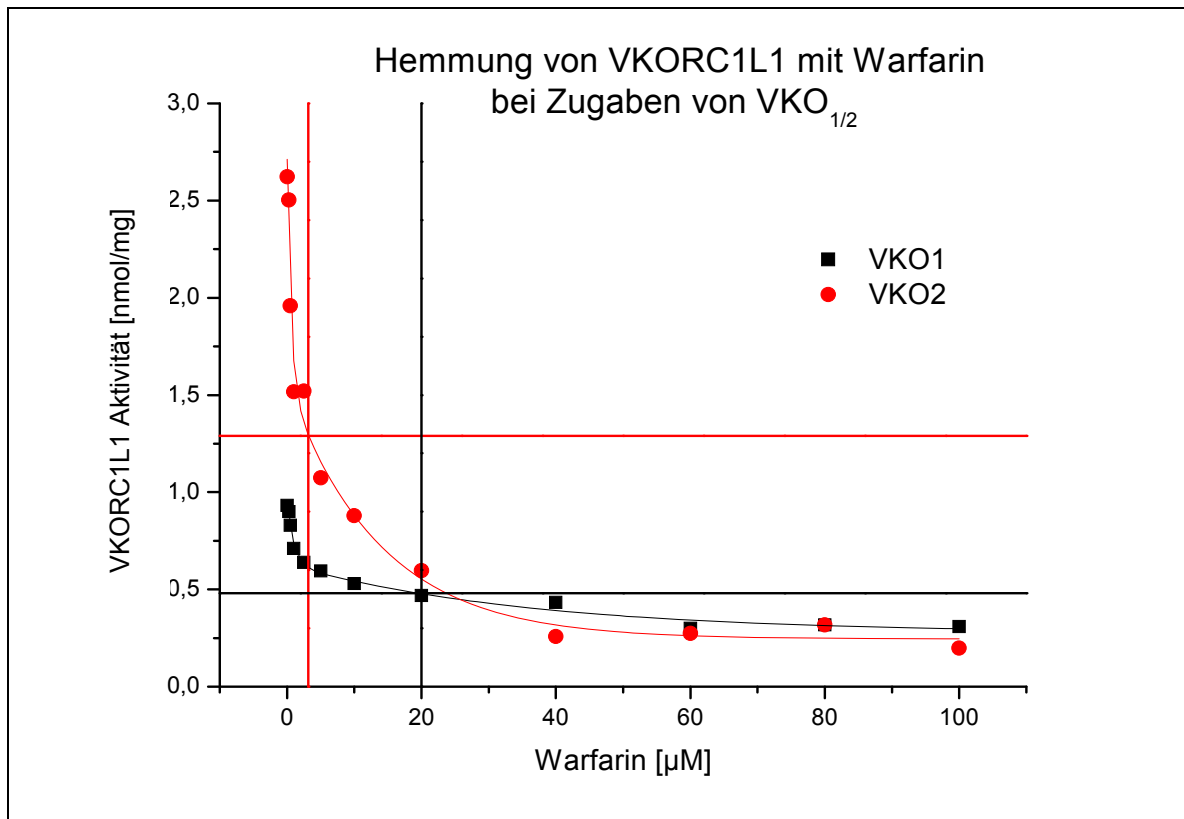


Abbildung 24: **VKORC1L1-Hemmung durch Warfarin mit unterschiedlichen Substraten.**

Die Linien zeigen den VKORC1L1 Umsatz in nmol Chinon /mg Protein. Die rote Linie entspricht Vitamin K2-Epoxid als Substrat, während die Vitamin K1-Epoxid Kurve schwarz angezeigt wird. Die blaue Linie markiert die halbmaximale Konzentration von VKO1 und die grüne von VKO2.

3.1.5 Mutagenese - Studien

Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenz von VKORC1 und VKORC1L1 konnte eine hohe Homologie festgestellt werden. Fünf Cysteine und ein Serin sind nach Lage und Abstand in beiden Proteinen hoch konserviert (siehe Abbildung 6). Durch Austausch der fünf Cysteine im VKORC1-Protein konnte die VKOR-Aktivität um bis zu 90 % gehemmt werden [207]. Wegen der strukturellen und enzymatischen Ähnlichkeit wurden entsprechende Mutagenesen auch im VKORC1L1-Protein durchgeführt, indem die Cystein-Codons zu Serin-Codons *in vitro* mutiert wurden. Die Einzelheiten der Mutagenese sind in Kapitel 4.1.3. beschrieben. Alle mutierten Konstrukte wurden vor der Transfektion durch Sequenzierung verifiziert. Die enzymatischen Aktivitäten der mutierten rekombinanten VKORC1L1-Proteine mit VKO1 bzw. VKO2 als Substrat sind in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt.

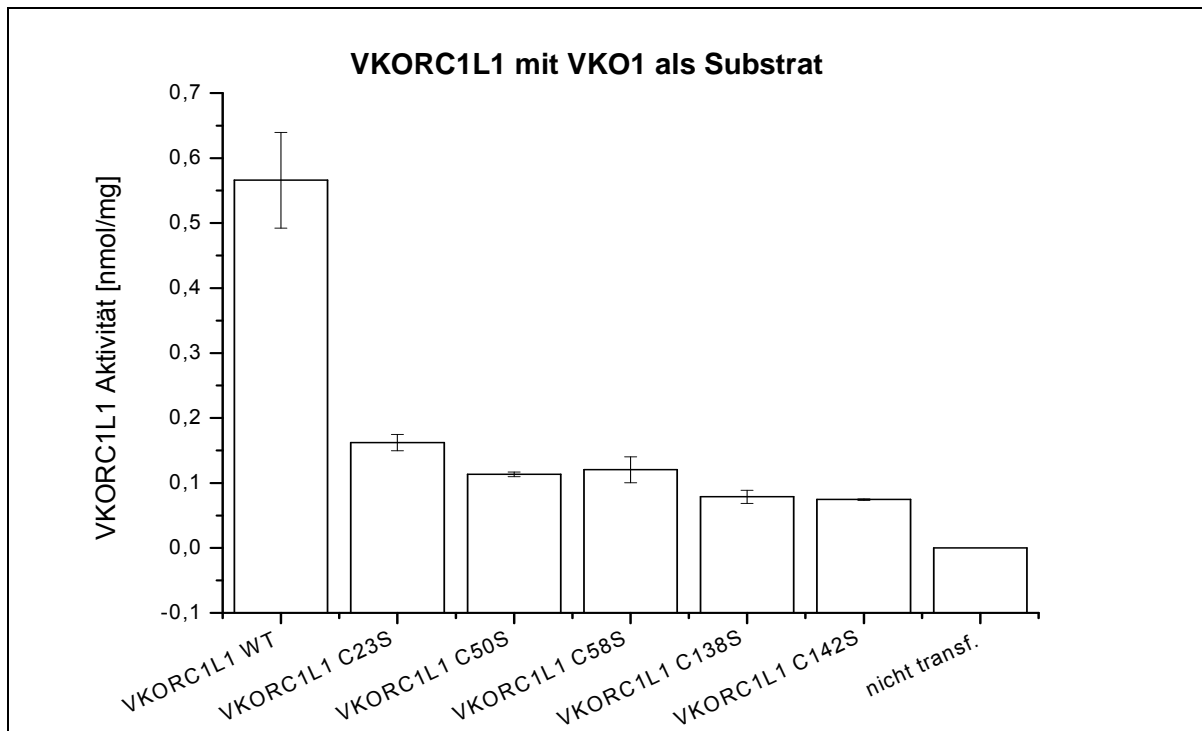


Abbildung 25: **VKO1-Umsatz bei Austausch der Cysteine in Serin.**

Umsatz an Vitamin K1-Chinon in nmol/mg bei VKORC1L1 Wildtyp sowie nach dem einzelnen Austausch der Cysteine durch Serin.

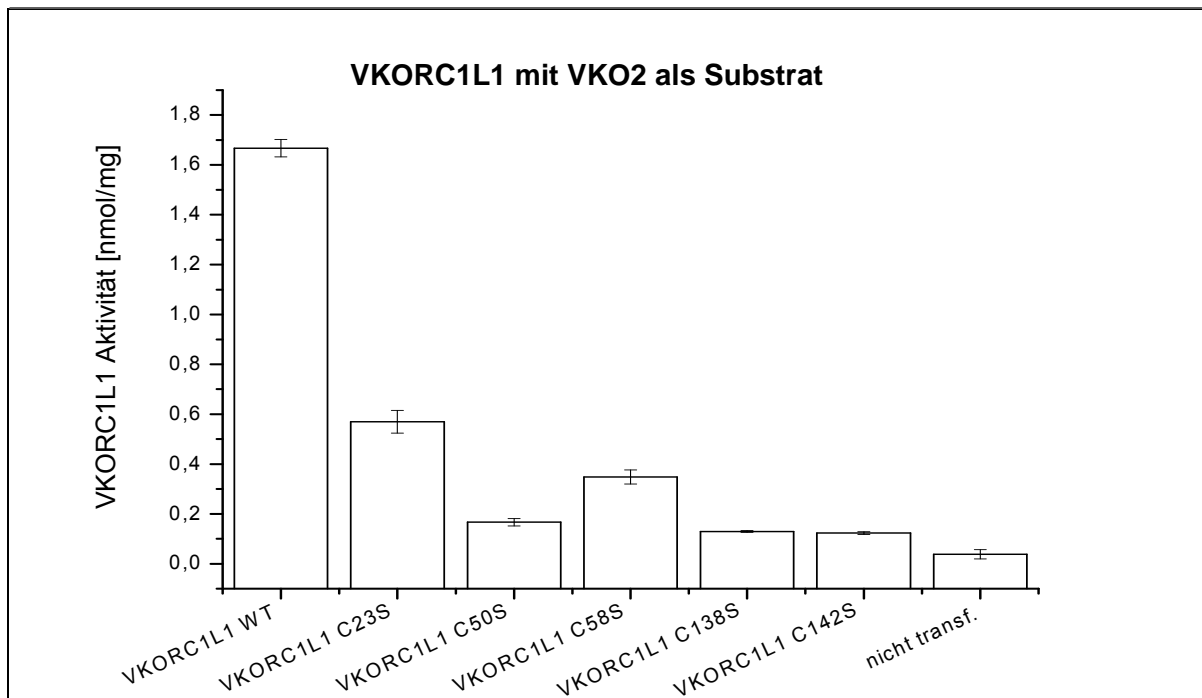


Abbildung 26: **VKO2-Umsatz bei Austausch der Cysteine in Serin.**

Umsatz an Vitamin K2-Chinon in nmol/mg bei VKORC1L1 Wildtyp sowie nach dem einzelnen Austausch der Cysteine durch Serin.

Die Aktivitätsänderung war bei beiden Vitamin K Epoxid-Formen als Substraten nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 27). Die Aktivität wird durch den Austausch der Cysteine in jeweils ein Serin um 70-90% verringert.

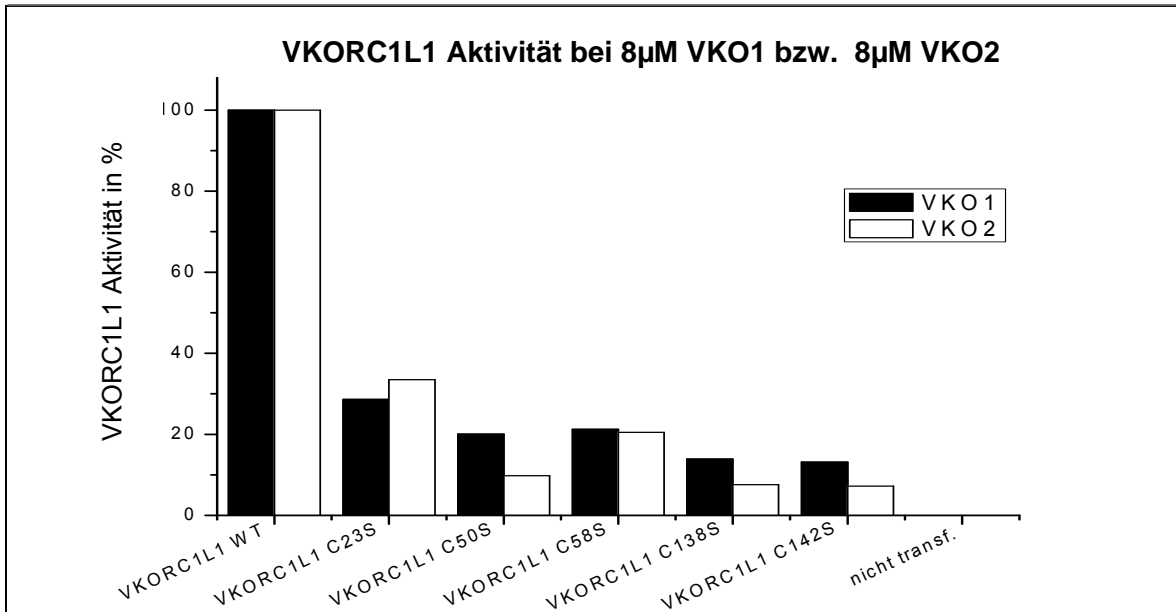


Abbildung 27: Vergleich der relativen VKORC1L1-Umsätze mit den beiden Vitamin K-Chinonen als Substraten (jeweils auf 100 % Aktivität des Wildtyps bezogen).

Auch bei den mutierten Proteinen lag der Gesamtumsatz in nmol/mg Chinon bei VKO2 als Substrat höher als bei VKO1 (siehe Abbildung 28)

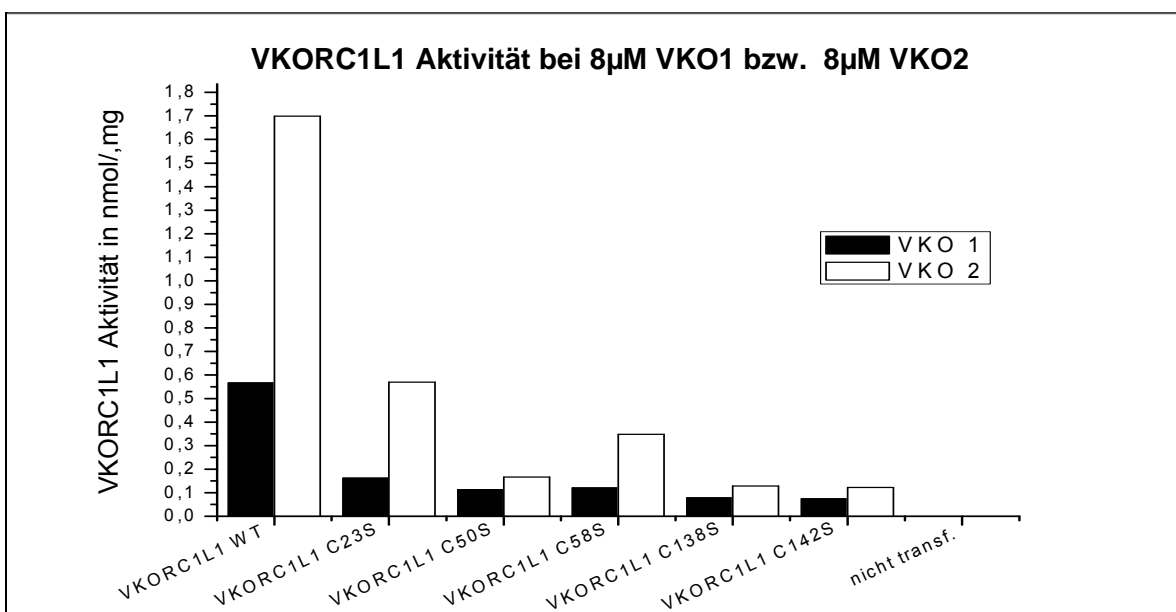


Abbildung 28: Vergleich der absoluten VKORC1L1-Umsätze mit den beiden Vitamin K-Chinonen als Substraten.

3.2 Suche nach Interaktionspartnern der Vitamin K Enzyme VKORC₁, VKORC_{1L1} und GGCX mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems

Das Split-Ubiquitin-System ermöglicht es, Proteininteraktionen von Membranproteinen *in vivo* mittels eines cDNA-Bank-Screens zu untersuchen (siehe Abschnitt 1.6.1).

Mit Hilfe dieses Systems sollten Interaktionspartner der paralogen Gene VKORC1 und VKORC1L1 sowie der γ -Glutamyl-Carboxylase mittels eines cDNA-Bank Screens gefunden werden.

3.2.1 Funktionaler Test der „Köder“- Konstrukte

Die korrekte, funktionelle Expression des Köders (in diesem Fall VKORC1, VKORC1L1 und GGCX) mit korrekter Topologie der Cub-LexA-VP16-Reporterkassette ist Voraussetzung für das Split-Ubiquitin-System.

Die richtige Orientierung der Konstrukte wurde mit Hilfe verschiedener Kontrollplasmide überprüft. Bei den Kontrollen handelt es sich um die Membranproteine Ost1, Fur4, Alg5 und Tom20 der Hefe. Hierzu wurde jeder „Köder“ jeweils mit einem Wildtyp NubI- und einem Mutanten NubG-fusionierten Kontrollplasmid in dem NMY32-Stamm koexprimiert. Die hohe Affinität von NubI zu Cub garantiert, dass die Fragmente bei richtiger Orientierung und Lokalisation interagieren und der Cub-LexA-VP16-Teil in das Zytoplasma gerichtet ist, so dass er von der Ubiquitin spezifischen Protease abgespalten werden kann.

Im funktionellen Assay wurden die Konstrukte im NMY32-Stamm auf SD-ade-leu-trp, SD-his-leu-trp und SD-leu-trp Selektionsmedium getestet (siehe Tabelle 5).

Kontroll- „Köder“- Protein	Affinität von Nub zu Cub	Erwartete Interaktion mit dem “Beute“- Protein
pOst1-NubI	stark	Starke Interaktion mit allen ausreichend exprimierten Ködern
pOst1-NubG	schwach	keine Interaktion
pAlg5-NubI	stark	Mögliche, schwache Interaktion mit einigen Ködern
pAlg5-NubG	schwach	keine Interaktion
pFur4-NubI	stark	Schwache Interaktion mit Ködern, die in der Plasmamembran lokalisiert sind.
pFur4-NubG	schwach	keine Interaktion
pTom20-NubI	stark	Starke Interaktion mit Ködern, die in der äußeren Mitochondrien Membran lokalisiert sind.
pTom20-NubG	stark	keine Interaktion
Leerer Vektor	keine Interaktion	keine Interaktion

Tabelle 5: Erwartete Ergebnisse bei positiven Funktionalitäts-Assays.

Bei beiden VKOR-Konstrukten kam es zu einer Interaktion mit dem Wildtyp NubI, während bei der Nub-G-Mutante keine Interaktion sichtbar war (siehe Abbildung 29). Daher kann man von einer Funktionalität der beiden VKOR-„Köder“ im Assay ausgehen.

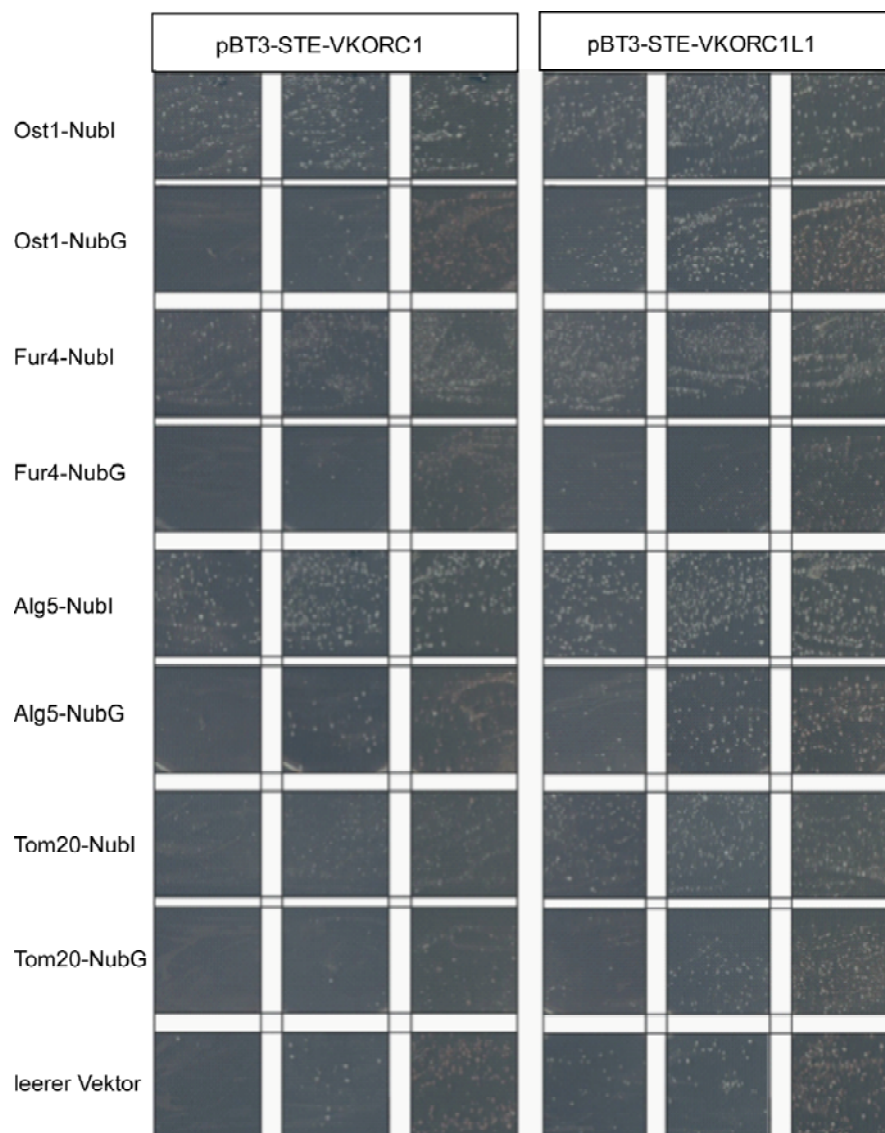


Abbildung 29: **Nachweis der VKOR-„Köder“-Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm NMY32.**

Die VKOR-Konstrukte wurden mit verschiedenen Kontrollplasmiden (Ost1, Fur4, Alg5 und Tom29) sowie mit einem leeren Vektor in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm NMY32 koexprimiert und auf Selektionsmedien (SD-trp-leu, SD-trp-leu-his und SD-trp-leu-ade) getestet. Die Positiv-Kontrolle NubI interagiert mit den VKOR-Konstrukten und führte zu zahlreichen Klonen, während bei den negativen Kontrollen, der Koexpression mit einem NubG-Fragment keine oder kaum Klone wuchsen.

Die γ -Glutamyl-Carboxylase wurde in zwei unterschiedlichen Expressionvectoren getestet. Zum einen wurde die Carboxylase im pBT3-STE-Vektor exprimiert, bei dem das C-terminale Ende und dadurch das fusionierte Reporterprotein ins Zytosol gerichtet ist. Zusätzlich wurde die Carboxylase in einem pBT3-N-Vektor exprimiert, bei dem das N-terminale Ende ins Zytoplasma zeigt.

Im funktionalem Assay konnte man bei der pBT-STE-GGCX Expression keine Klone mit dem Wildtyp-NubI-Fragment feststellen, was gegen eine funktionelle Expression des Reporterproteins spricht, während bei der pBT-N-GGCX Expression auch eine Interaktion mit der NubG-Mutante sichtbar waren (siehe Abbildung 30). Dadurch konnte keines der beiden GGCX-Konstrukte für den Split-Ubiquitin-Assay verwendet werden.

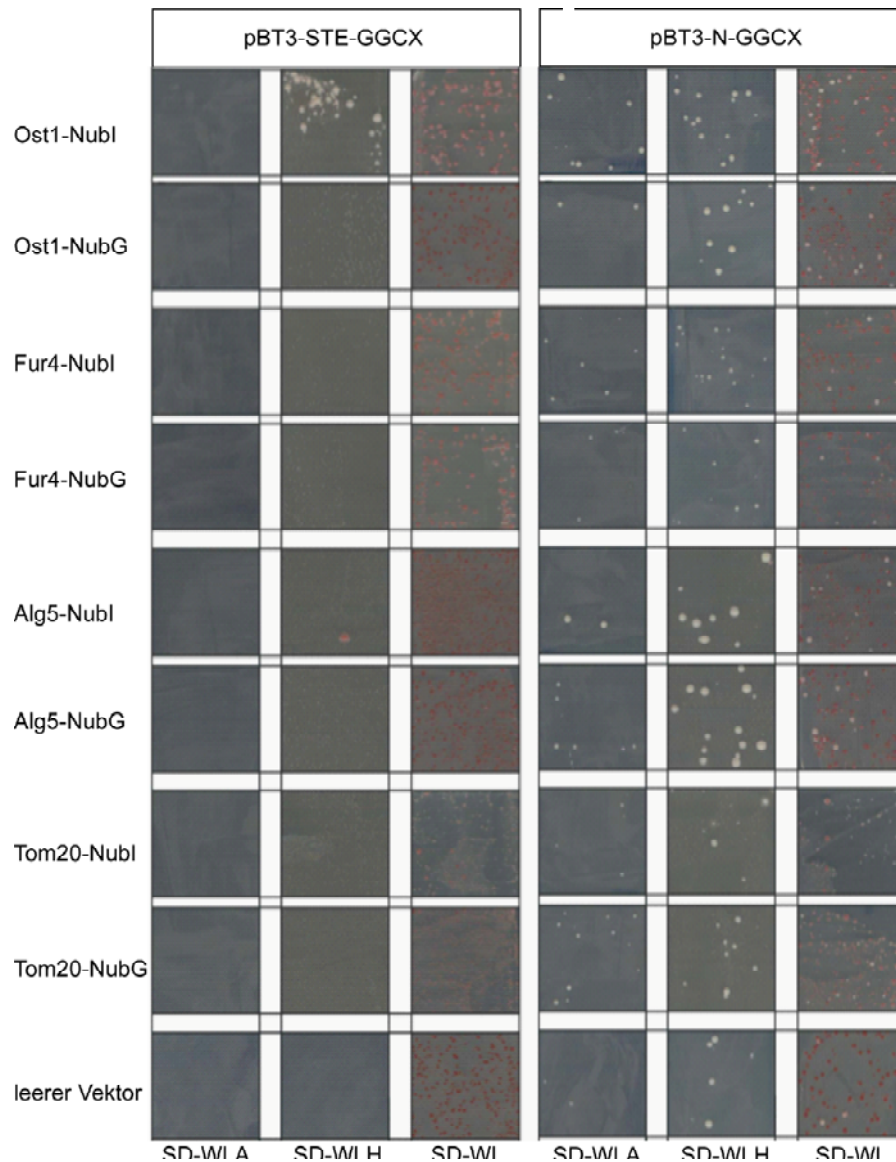


Abbildung 30: Nachweis der GGCX-„Köder“-Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm NMY32.

Die GGCX-Konstrukte wurden mit verschiedenen Kontrollplasmiden (Ost1, Fur4, Alg5 und Tom29) sowie mit einem leeren Vektor in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm NMY32 koexprimiert und auf Selektionsmedien (SD-trp-leu, SD-trp-leu-his und SD-trp-leu-ade) getestet. Die Positiv-Kontrolle NubI interagiert nicht mit den GGCX-Konstrukten und die Negativ-Kontrolle, die Koexpression mit einem NubG-Fragment, zeigte genauso viele Klone wie die positive Kontrolle, wodurch beide Konstrukte nicht für einen cDNA-Screen geeignet sind.

3.2.2 Screen der Leberzell-spezifischen cDNA-Bank

Beide VKOR-Konstrukte wurden gegen eine Leberzell-spezifische cDNA-Bank (*human adult liver NubG-X library*; P0220; Dualsystems Biotech) gescreent, da bei beiden VKOR-Proteinen die Expressionrate in der Leber am stärksten ist [15,83]. Hinzu kommt, dass die γ -Glutamyl-Carboxylase ebenfalls primär in der Leber exprimiert wird und die Interaktion von VKORC1 und GGCX eine häufig publizierte Hypothese ist [43]. Als Klonbank-Vektor wurde pPR3-N mit einer NubG-x Orientierung verwendet (siehe Abschnitt 2.1.4). Die Klonbank enthält ca. $1,5 \times 10^6$ humane Genfragmente, wobei die durchschnittliche Größe der Klone ca. 1,3 kb beträgt.

Vor dem eigentlichen cDNA-Bank-Screen wurden Vorversuche durchgeführt, um die Konditionen für den Assay zu optimieren. Dies beinhaltet negative als auch positive Kontrollen, sowie einen Schritt, bei dem die Klone auf einem Selektionsmedium überprüft werden, welches unterschiedliche Mengen von 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) enthält. Dadurch konnte die Sensitivität gegenüber dem *HIS3* Reporter gen bestimmt werden.

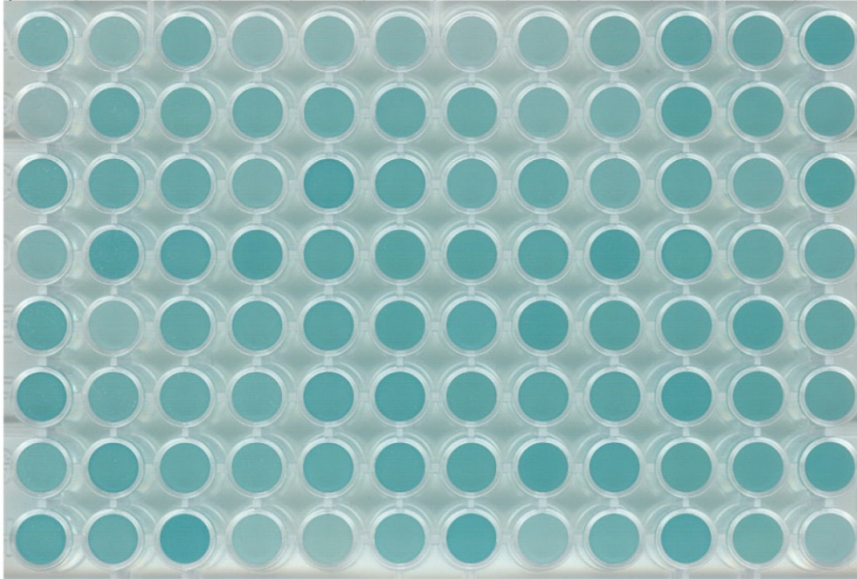
Die erste Selektion geschah über ein Selektionsmedium, dem die Aminosäure Histidin und Adenin fehlen (SD-trp-leu). Die zweite Selektion nutzte als semi-quantitatives Verfahren die β -Galaktosidase-Aktivität.

191 VKORC1-Klone und 120-VKORC1L1 Klone, die sowohl im ersten als auch im zweiten Selektionsverfahren positiv getestet wurden, wurden gepickt, erneut ausplattiert und wieder auf die gleiche Weise getestet. Hierbei zeigten alle 191 VKORC1- und 119 VKORC1L1-Kandidaten eine Aktivität. Insgesamt konnten daher 310 Klone positiv auf Histidin/Adenin und LacZ getestet werden.

Die Klone können anhand der Stärke der Blaufärbung in der β -Galaktosidase-Reaktion ausgewählt werden. Da die Intensität der Färbung bei fast allen Klonen nahezu identisch war (siehe Abbildung 31 und 32), wurden von allen Klone die Plasmide isoliert und anschließend sequenziert.

Platte A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96



Platte B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

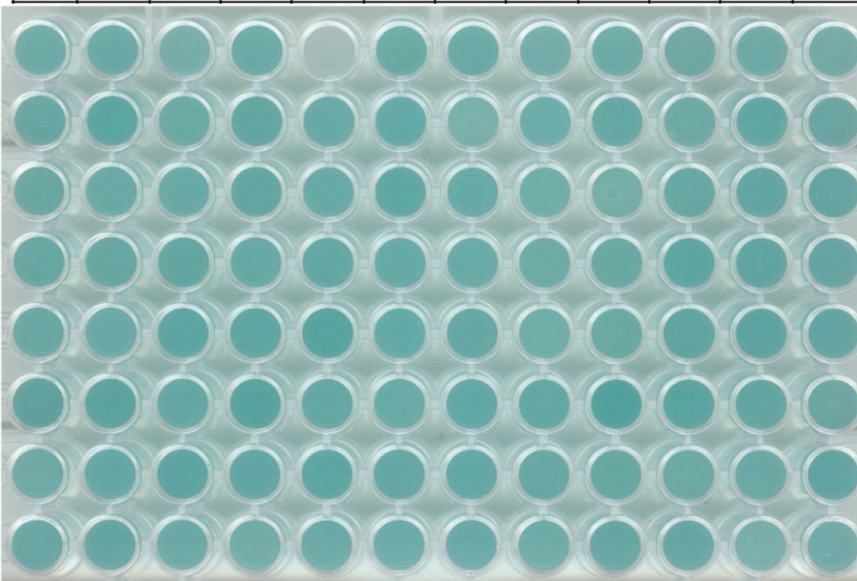


Abbildung 31: VKORC1-Treffer im β -Galaktosidase Assay.

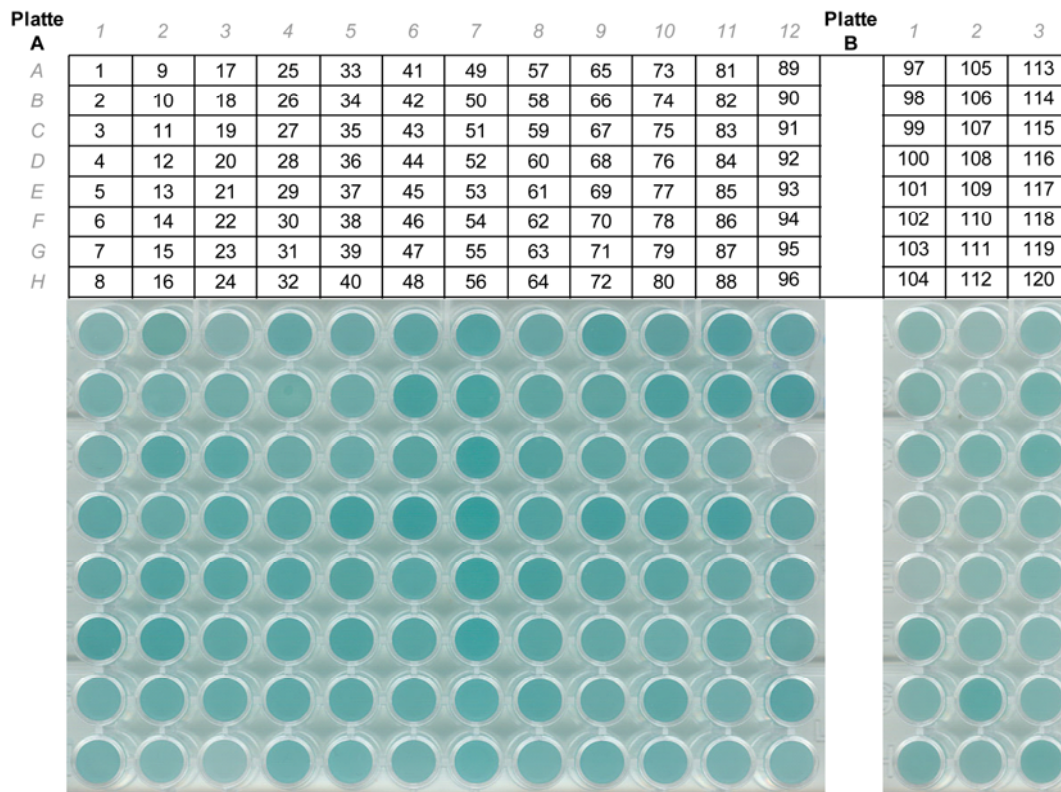


Abbildung 32: VKORC1L1-Treffer im β -Galaktosidase Assay.

Plasmid-Isolierung und Sequenzierung wurde wie in Kapitel 2.2.5 und 2.2.7 beschrieben durchgeführt und die Sequenzen mit dem Nucleotid-BLAST-Algorithmus zugeordnet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Da es, wie erwartet, Mehrfachtreffer gab, wurden die Ergebnisse nach der Trefferhäufigkeit aufgelistet (siehe Tabelle 6 und 7).

Anzahl der Treffer	Plasmid	Accession
19	Homo sapiens CD63 molecule (CD63)	NM_001040034.1
17	Homo sapiens emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)	NM_006579.1
16	Homo sapiens stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)	NM_014445.3
8	Homo sapiens Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1)	NM_024006.4
6	Homo sapiens proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched) (PLP2)	NM_002668.1
6	Homo sapiens VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C (VAPB)	NM_004738.3
5	Homo sapiens transferrin (TF)	NM_001063.2
4	Homo sapiens mitochondrion, complete genome	NC_001807.4
4	<i>Homo sapiens protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)</i>	NM_005742.2
4	Homo sapiens serum amyloid A1 (SAA1)	NM_199161.2
3	Homo sapiens haptoglobin (HP)	NM_005143.2
3	<i>Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6)</i>	NM_003153.3
3	Homo sapiens transmembrane protein 134 (TMEM134)	NM_025124.2
2	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 (SERPINA1)	NM_000295.3
2	Homo sapiens surfait 4 (SURF4)	NM_033161.2
2	Homo sapiens homer homolog 2 (Drosophila) (HOMER2)	NM_004839.2
2	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)	NM_001671.2
2	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 147 (C14orf147)	NM_138288.3
2	Homo sapiens fibrinogen-like 1 (FGL1)	NM_004467.3
2	Homo sapiens hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)	NM_021175.2
2	Homo sapiens haptoglobin-related protein (HPR)	NM_020995.3
2	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2)	NM_080912.2
2	Homo sapiens ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5 (ARL6IP5)	NM_006407.3
2	Homo sapiens receptor accessory protein 5 (REEP5)	NM_005669.4
2	Homo sapiens calponin 3, acidic (CNN3)	NM_001839.2
2	Homo sapiens required for meiotic nuclear division 5 homolog A (S.cerevisiae) (RMND5A).	NM_022780.2
2	Homo sapiens dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit (DPM2)	NM_003863.2
2	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (PPIB)	NM_000942.4
2	Homo sapiens B-cell receptor-associated protein 31 (BCAP31)	NM_005745.6
1	Homo sapiens protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR)	NM_006404.3
1	Homo sapiens gap junction protein, beta 1, 32kDa (GJB1)	NM_001097642.1
1	<i>Homo sapiens ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3</i>	NM_001689.4
1	<i>Homo sapiens ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2 (ATP6AP2)</i>	NM_005765.2
1	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1)	NM_002970.1
1	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent (C1S)	NM_201442.1
1	Homo sapiens CD9 molecule (CD9)	NM_001769.2
1	Homo sapiens apolipoprotein C-IV (APOC4)	NM_001646.1
1	Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae) (YIF1A)	NM_020470.1

1	Homo sapiens transmembrane protein 176A (TMEM176A)	NM_018487.2
1	Homo sapiens ferritin, light polypeptide (FTL)	NM_000146.3
1	Homo sapiens apolipoprotein A-I (APOA1)	NM_000039.1
1	Homo sapiens fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae)	NM_016068.2
1	Homo sapiens transmembrane protein 45B (TMEM45B)	NM_138788.3
1	Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2)	NM_001643.1
1	Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 (HSD17B7)	NM_016371.2
1	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3)	NM_021034.2
1	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_110327)	NM_001838476.1
1	<i>Homo sapiens histone deacetylase 6 (HDAC6)</i>	NM_006044.2
1	Homo sapiens alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)	NM_001622.2
1	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2)	NM_080913.2
1	Homo sapiens transmembrane BAX inhibitor motif containing 4 (TM6SF2)	NM_016056.2
1	Homo sapiens jagunal homolog 1 (Drosophila) (JAGN1)	NM_032492.2
1	Homo sapiens pyrophosphatase (inorganic) 2 (PPA2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_006903.4
1	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30 (C20orf30)	NM_001009925.1
1	Homo sapiens protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PCMT1)	NM_005389.1
1	Homo sapiens phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class H (PIGH)	NM_004569.3
1	Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_1103)	NW_001838059.1
1	Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL)	NM_006745.3
1	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 61 (C17orf61)	NM_152766.2
1	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 56 (C10orf56)	NM_153367.2
1	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 35 (C6orf35)	NM_018452.3
1	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 129 (C6orf129)	NM_138493.2
1	Homo sapiens methyltransferase like 7B (METTL7B)	NM_152637.1
1	Homo sapiens small nucleolar RNA, H/ACA box 12 (SNORA12) on chromosome 10	NR_002954.1
1	Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1 (ECHDC1)	NM_001002030.1
1	Homo sapiens translocation associated membrane protein 1 (TRAM1)	NM_014294.4
1	<i>Homo sapiens selenoprotein X, 1 (SEPX1)</i>	NM_016332.2
1	Homo sapiens three prime repair exonuclease 1 (TREX1)	NM_033629.2
1	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 (APLP2)	NM_001642.1
1	Homo sapiens apolipoprotein C-I (APOC1)	NM_001645.3
1	Homo sapiens metallothionein 1X (MT1X)	NM_005952.2
1	PREDICTED: Homo sapiens similar to ZMYM6 protein (LOC100130633)	XM_001725169.1
1	<i>Homo sapiens solute carrier family 31 (copper transporters), member 2 (SLC31A2)</i>	NM_001860.2
1	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30 (C20orf30)	NM_001009925.1
1	Homo sapiens coxsackie virus and adenovirus receptor (CXADR)	NM_001338.3
1	<i>Homo sapiens solute carrier family 15, member 3 (SLC15A3)</i>	NM_016582.1
1	Homo sapiens fibrinogen gamma chain (FGG), transcript variant	NM_000509.4

	gamma-A	
1	Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 17 (KCNK17)	NM_031460.3
1	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)	NM_001671.2
1	Homo sapiens apolipoprotein A-II (APOA2)	NM_001643.1
1	Homo sapiens transmembrane protein 120A (TMEM120A)	NM_031925.1
1	Homo sapiens apolipoprotein C-III (APOC3)	NM_000040.1
1	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1 (SLC25A1)	NM_005984.1
1	Homo sapiens CD81 molecule (CD81)	NM_004356.3
1	Homo sapiens coiled-coil domain containing 12 (CCDC12)	NM_144716.2
1	Homo sapiens fibrinogen beta chain (FGB)	NM_005141.2
1	Homo sapiens claudin 10 (CLDN10)	NM_006984.3
1	Homo sapiens protocadherin 1 (PCDH1)	NM_032420.2
1	Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT)	NM_000754.2
1	Homo sapiens family with sequence similarity 82, member B (FAM82B)	NM_016033.2

Tabelle 6: **Liste der VKORC1-Interaktionstreffer.**

Die fett markierten Treffer wurden näher untersucht. Die kursiv markierten Treffer sind, laut Auskunft von Dualsystems, häufige Treffer im Split-Ubiquitin System. Insgesamt wurden 90 Kandidaten gefunden.

Anzahl der Treffer	Plasmid	Accession
17	Homo sapiens CD63 molecule (CD63)	NM_001780.4
12	Homo sapiens stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)	NM_014445.3
9	Homo sapiens emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)	NM_006579.1
8	Homo sapiens hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)	NM_021175.2
7	Homo sapiens vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1)	NM_024006.4
5	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2)	NM_001181.3
4	Homo sapiens haptoglobin-related protein (HPR)	NM_020995.3
4	Homo sapiens serum amyloid A1 (SAA1)	NM_199161.2
3	<i>Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced (STAT6)</i>	NM_003153.3
3	Homo sapiens transferrin (TF)	NM_001063.2
3	Homo sapiens ferritin, light polypeptide (FTL)	NM_000146.3
2	Homo sapiens serum amyloid A2 (SAA2)	NM_030754.2
2	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 30 (C20orf30)	NM_001009925.1
2	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 24 (C15orf24)	NM_020154.2
2	Homo sapiens phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class H (PIGH)	NM_004569.3
2	Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6 (UGT1A6)	NM_001072.3
2	<i>Homo sapiens asparagine-linked glycosylation 3 homolog (S. cerevisiae, alpha-1,3-mannosyltransferase) (ALG3)</i>	NM_005787.4
1	Homo sapiens complement factor H-related 1 (CFHR1)	NM_002113.2
1	<i>Homo sapiens translocation associated membrane protein 1 (TRAM1)</i>	NM_014294.4
1	<i>Homo sapiens VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and</i>	NM_004738.3

	<i>C (VAPB)</i>	
1	Homo sapiens transmembrane protein 14A (TMEM14A)	NM_014051.3
1	Homo sapiens apolipoprotein C-III (APOC3)	NM_000040.1
1	Homo sapiens B-cell receptor-associated protein 31 (BCAP31)	NM_005745.6
1	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)	NM_001671.2
1	Homo sapiens transmembrane protein 45B (TMEM45B)	NM_138788.3
1	Homo sapiens transmembrane protein 176A (TMEM176A)	NM_018487.2
1	Homo sapiens HERPUD family member 2 (HERPUD2)	NM_022373.3
1	Homo sapiens keratinocyte associated protein 2 (KRTCAP2)	NM_173852.3
1	<i>Homo sapiens signal peptidase complex subunit 1 homolog (S. cerevisiae) (SPCS1)</i>	NM_014041.2
1	<i>Homo sapiens cytochrome b5 type A (microsomal) (CYB5A)</i>	NM_148923.2
1	Homo sapiens group-specific component (vitamin D binding protein) (GC)	NM_000583.2
1	Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, reference assembly	NT_011255.14
1	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 1 (C14orf1)	NM_007176.1
1	<i>Homo sapiens cytochrome b-561 domain containing 2 (CYB561D2)</i>	NM_007022.3
1	Homo sapiens apolipoprotein A-I (APOA1)	NM_000039.1
1	Homo sapiens FUN14 domain containing 2 (FUNDC2)	NM_023934.3
1	PREDICTED: Homo sapiens similar to ZMYM6 protein (LOC100130633)	XM_001725169.1
1	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7 (DHRS7)	NM_016029.1
1	Homo sapiens NEFA-interacting nuclear protein NIP30 (NIP30)	NM_024946.2
1	Homo sapiens transmembrane protein 176B (TMEM176B)	NM_001101312.1
1	<i>Homo sapiens ubiquitin C (UBC)</i>	NM_021009.4
1	<i>Homo sapiens peroxiredoxin 4 (PRDX4)</i>	NM_006406.1
1	<i>Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT)</i>	NM_000754.2
1	Homo sapiens calponin 3, acidic (CNN3)	NM_001839.2
1	Homo sapiens immediate early response 3 interacting protein 1 (IER3IP1)	NM_016097.3
1	Homo sapiens mitochondrion, complete genome	NC_001807.4
1	Homo sapiens Williams Beuren syndrome chromosome region 18 (WBSCR18)	NM_032317.2
1	Homo sapiens tetraspanin 6 (TSPAN6)	NM_003270.2
1	Homo sapiens histone deacetylase 6 (HDAC6)	NM_006044.2

Tabelle 7: **Liste der VKORC1L1-Interaktionstreffer.**

Die kursiv unterlegten Treffer sind, laut Dualsystems, häufige Treffer im Split-Ubiquitin System. Insgesamt wurden 49 Kandidaten gefunden.

Nach Berücksichtigung der Mehrfach-Treffer und Abzug der bekanntermaßen häufig falsch-positiven Klone (in Tabelle 6 und 7 kursiv gedruckt) blieben für VKORC1 insgesamt 83 Gene und für VKORC1L1 39 Gene als mögliche Interaktionspartner übrig. Für eine weitere Charakterisierung musste die Anzahl der Kandidaten verringert werden. Dazu wurden folgende Überlegungen angestellt:

1. Häufigkeit der Treffer. Sofern eine unspezifische Reaktion ausgeschlossen werden kann, sollte die Häufigkeit der Identifizierung im Screen ein ungefähres Maß für die Stärke der Interaktion sein.
2. Vergleicht man beide Trefferlisten, so fallen Proteine auf, die sowohl durch VKORC1 als auch durch VKORC1L1 als Köder gefischt wurden. Wegen der hohen Sequenzhomologie der beiden Proteine könnte man das als unabhängige „Bestätigungsexperimente“ ansehen.
3. Besonders berücksichtigt wurden weiterhin Proteine, die nachgewiesener Maßen oder aufgrund von Hypothesen bereits als Interaktionspartner der VKOR-Proteine in der Diskussion sind.
4. Ferner waren alle Proteine von Interesse, die nachgewiesen oder vermutet an Redox-Prozessen oder am Vitamin K-Stoffwechsel beteiligt sind.

In Tabelle 8 sind diejenigen Proteine aufgelistet, die aufgrund der genannten Kriterien für eine weitere Untersuchung in Betracht gezogen wurden.

Beute:	Köder: VKORC1 VKORC1L1	
	Trefferanzahl	
CD63 molecule (CD63)	19	17
emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)	17	9
stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)	16	12
vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1)	8	7
protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)	4	0
fibrinogen gamma chain (FGG), transcript variant gamma-A	1	0

Tabelle 8: **Interessante Kandidaten, die häufig von VKORC1 und VKORC1L1 gefunden wurden.**

3.2.3 Köder-Abhängigkeits Test

Die das Screening einer cDNA-Klonbank immer auch falsch-positive Ergebnisse liefern kann, wurden die 6 Kandidaten aus Tabelle 8 ausgewählt und als Einzelklone nochmals auf ihrer Interaktion im Split-Ubiquitin-System getestet.

Hierzu wurden die isolierten Plasmide der Kandidaten einzeln mit dem „Köder“-Konstrukt (VKORC1 oder VKORC1L1) in Hefe koexprimiert und wieder auf Selektionsmedium getestet. (siehe Abbildung 33 und 34)

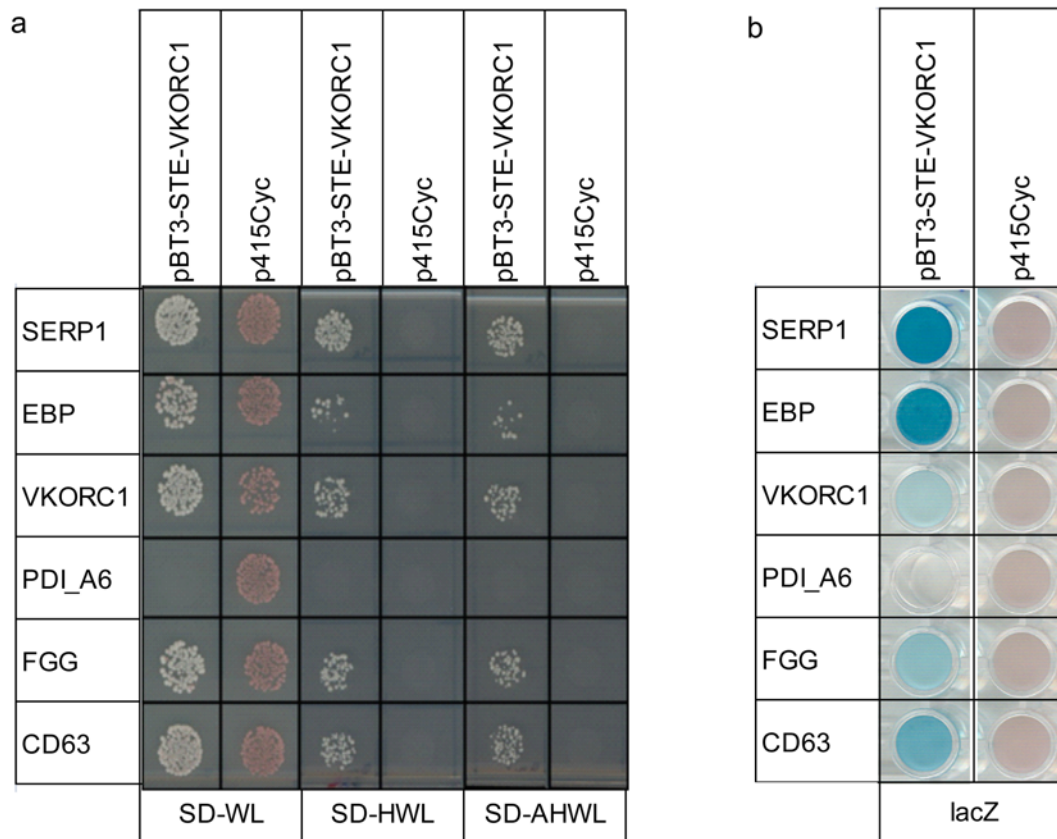


Abbildung 33: **VKORC1-Einzelklon Interaktions-Analyse.**

Retransformation der Interaktionskandidaten SERP1, EBP, VKORC1, PDIA6, FGG und CD63 mit VKORC1 und einem Kandidaten ohne Bezug (p415Cyc= negativ Kontrolle)

a) Die erneut in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm NMY32 exprimierten Klone wurden auf Transformations-Selektionsmedium (SD-WL) und auf Selektionsmedium, welches die Reporterogenaktivität bestimmt (SD-HWL, SD-AHWL), ausplattiert. Die p415Cyc Negativ-Kontrolle konnte nur auf dem Transfektions-Selektionsmedium wachsen, während die Interaktionskandidaten bis auf die PDIA6 auf allen Selektionsmedien Kolonien bildeten. Man kann daher davon ausgehen, dass die Koexpression von VKORC1 und PDIA6 nicht funktioniert hat.

b) HTX assay Ergebnisse (lacZ) von den gepaarten Hefe-Kolonien: Alle Interaktionskandidaten mit Ausnahme der PDIA6 konnten mittels der γ -Galaktosidase-Assays bestätigt werden.

Im Einzel-Interaktions-Test mit VKORC1 konnten alle untersuchten Plasmide bis auf die PDIA6 bestätigt werden. Bei der PDIA6-VKORC1 Koexpression fehlt der Hefe entweder eines der beiden Plasmide oder die Kombination der beiden Proteine ist toxisch für die Hefe (Information K. Rutschmann, DUALSystems).

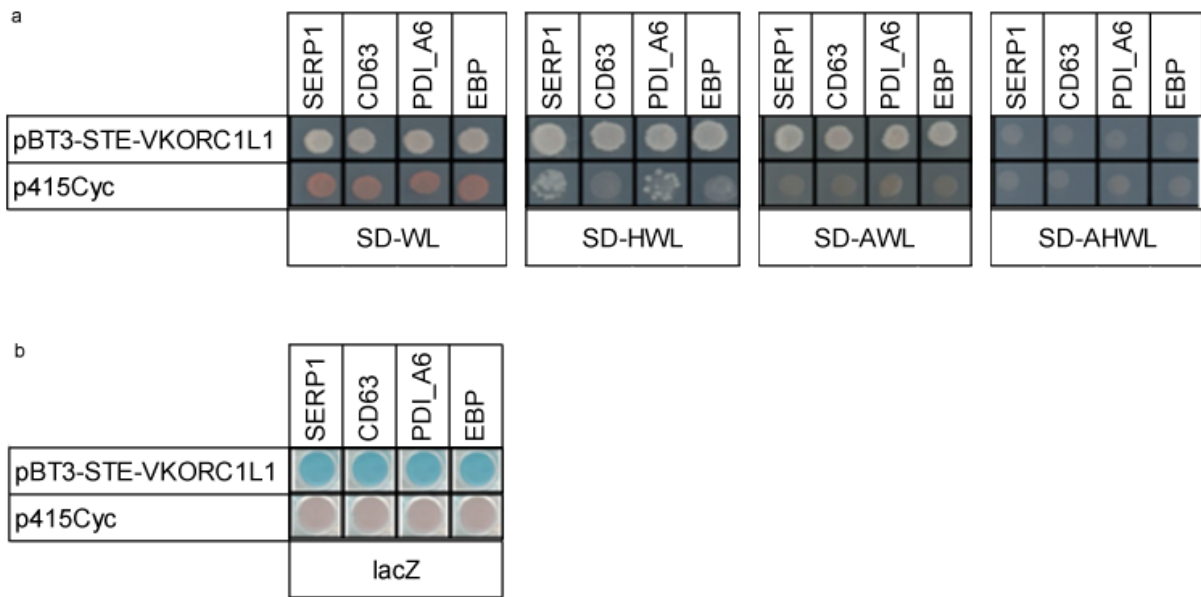


Abbildung 34: **VKORC1L1-Einzelklon Interaktions-Analyse.**

Retransformation der Interaktionskandidaten SERP1, CD63, PDIA6 und EBP mit VKORC1L1 und einem Kandidaten ohne Bezug (p415Cyc= negative Kontrolle)

a) Die erneut in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm NMY32 exprimierten Klone wurden auf Transformations-Selektionsmedium (SD-WL) und auf Selektionsmedium, welches die Reporterogenaktivität bestimmt (SD-HWL, SD-AWL, SD-AHWL), ausplattiert. Die p415Cyc Negative-Kontrolle konnte nur auf dem Transfektions-Selektionsmedium wachsen, während die gefragten Interaktionskandidaten allen Selektionsmedien Kolonien bildeten.

b) HTX assay Ergebnisse (lacZ) von den gepaarten Hefe Kolonien: Alle Interaktionskandidaten konnten auch mittels der β -Galaktosidase- Assays bestätigt werden.

Im VKORC1L1-spezifischen Einzell-Interaktions-Test konnten alle untersuchten Plasmide bestätigt werden, auch die PDIA6.

3.3 Ko-Immünpräzipitation

Die Ko-Immünpräzipitation ist eine Methode, mit der man *in vitro* Protein-Interaktionen untersuchen kann.

Die verwendeten Konstrukte der Kandidatenproteine wurden mit einem MycHis-Tag gekoppelt, während das Köderprotein VKORC1 ein Flag-Tag erhielt (siehe Abschnitt 2.4.5). Die Molekülmassen der resultierenden Konstrukte sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Plasmid	Protein (kDa)	Sequenzlänge	Größe auf Gel (kDa)
SERP1-MycHis	7,4	66 AA	9,7
CD63-MycHis	25,6	238 AA	27,9
FGG-MycHis	51,5	453 AA	53,1
PDIA6-MycHis	48,1	440 AA	50,4
EPB-MycHis	26,35	230 AA	28,65
VKORC1-MycHis	18,2	163 AA	20,5
VKORC1L1-MycHis	19,8	176 AA	22,1
VKORC1-Flag	18,2	163 AA	19,29

Tabelle 9: **Konstrukt-Größen in kDa.**

3.3.1 Expressionstest

Um die Spezifität der Immunpräzipitation sicher zu stellen, wurden die Proteine einzeln exprimiert, mittels Flag- bzw. Myc-Agarose präzipitiert, durch eine SDS-PAGE getrennt und nach Western Blot mit dem jeweiligen Antikörper (z.B. SERP1-MycHis IP-Lysat mit einem anti-Myc Antikörper) nachgewiesen.

VKORC1-, VKORC1L1-, CD63-, SERP1- und EBP-Myc können nach Präzipitation mit Myc-Agarose nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35A, Spalte 2, 3, 4, 5 und 6), während FGG- und PDIA6-Myc nur ungekoppelt im Zelllysate nachgewiesen werden können (siehe Abbildung 35B, Spalte 4 und 7), da beide etwa auf der gleichen Höhe laufen wie die 50kDa IgG-Bande.

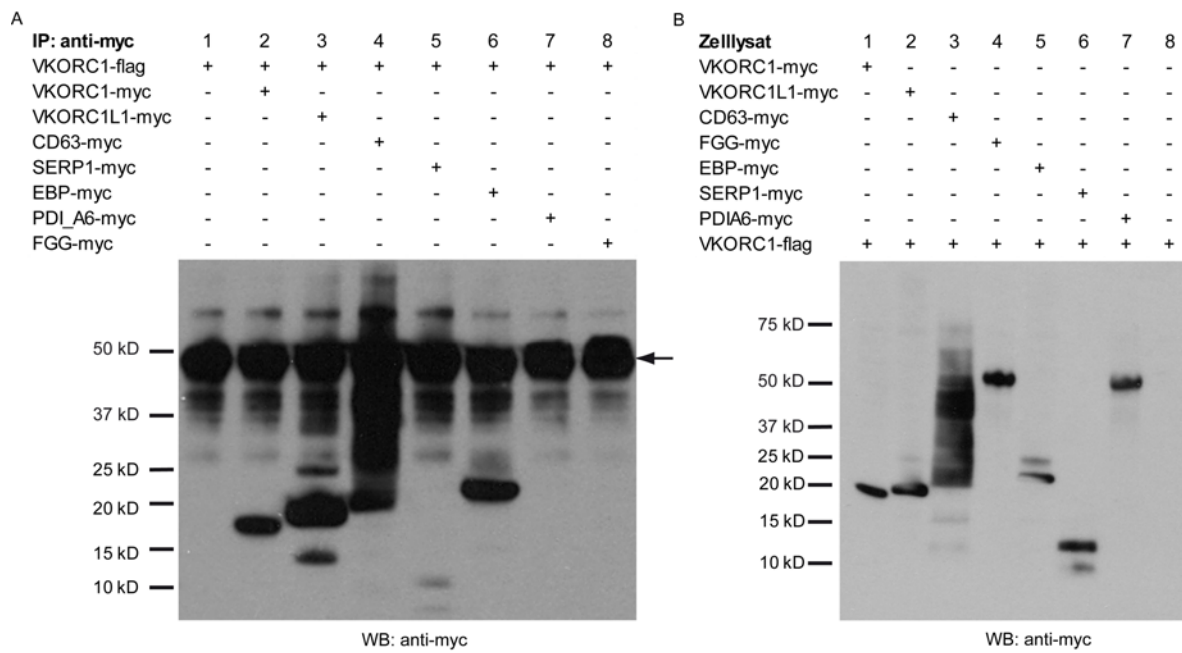


Abbildung 35: **Immunpräzipitation mit Myc-Agarose und Nachweis mit anti-Myc-Antikörper.**

A: In Spalte 1 ist VKORC1-Flag aufgetragen, welches nicht von dem anti-Myc Antikörper detektiert wird. Alle Myc-getaggten Proteine, bis auf PDIA6 und FGG, konnten mittels Myc-Antikörper detektiert werden. PDIA6 und FGG laufen auf der gleichen Höhe wie die 50 kDa IgG-Bande, die als Ladekontrolle dient. Man kann (bis auf PDIA6 und FGG) feststellen, dass die Konstrukte an Myc-Agarose binden.

B: Anhand von Zell-Lysaten konnte mit Hilfe des Myc-Antikörpers die erfolgreiche Expression von FGG- (Spalte 4) und PDIA6-Myc (Spalte 7) bestätigt werden.

Als Kontrollexperiment wurde die Immunpräzipitation auch mit Flag-Agarose durchgeführt. Alle Konstrukte mit einem Myc-Tag sollten dabei nicht präzipitiert werden, wohl aber das Köder-Konstrukt VKORC1-Flag.

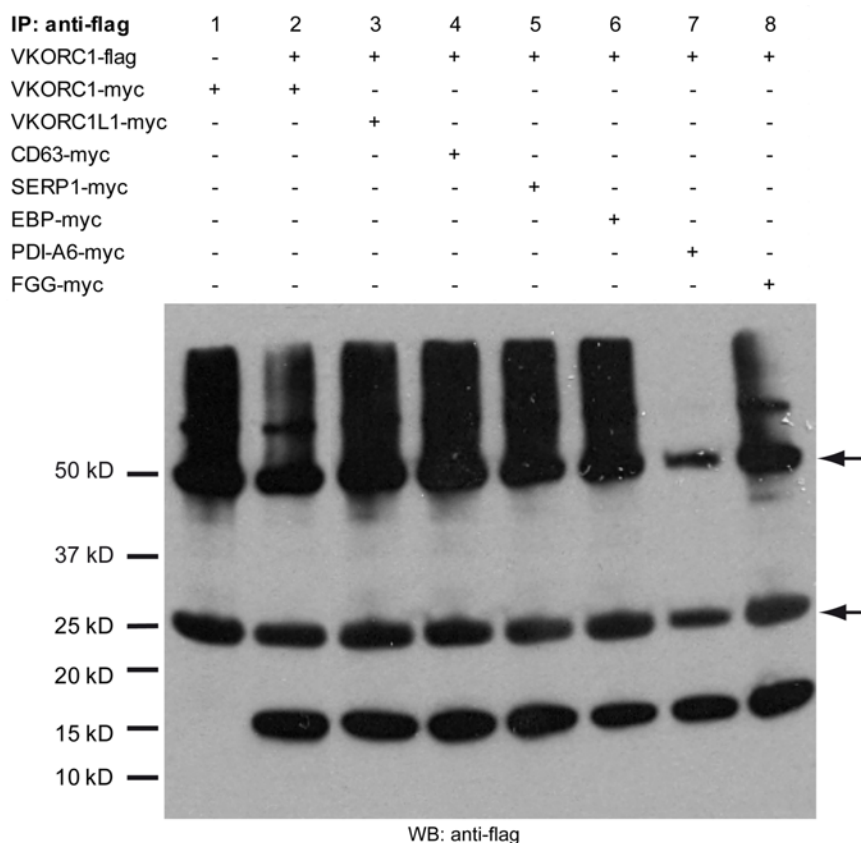


Abbildung 36: **Immunpräzipitation mit Flag-Agarose und anti-Flag-Antikörper.**

VKORC1-Flag läuft auf der Höhe von ~19,3kDa. Die 25kDa und 50kDa IGG Bande (Pfeile) dienen als Ladekontrolle. VKORC1-Myc (Spalte 1), sowie die koexprimierten Konstrukte lassen sich nicht mit dem anti-Flag-Antikörper detektieren (Größen siehe Tabelle 8).

3.3.2 Ko-Immunpräzipitationen

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden unterschiedliche Tags auf Köder- und Beuteprotein verteilt und beide Konstrukte gemeinsam exprimiert. Das Köderprotein VKORC1 wurde mit einem Flag-Tag versehen und die Beuteproteine mit Myc-getaggt.

Zur Präzipitation wurde getaggte-Agarose verwendet. Durch mehrmaliges Waschen des Agarose/Protein-Komplexes wurden nicht gekoppelte Proteine weitestgehend entfernt.

Bei den Beuteproteinen, die mit VKORC1 interagieren, sollten nach Auftragen des Myc-Agarose-Lysats auf einem Western-Blot mit Hilfe eines Flag-Antikörpers anschließend das VKORC1-Flag getaggt nachgewiesen werden können (siehe Abbildung 37).

In Abbildung 37 sieht man, dass VKORC1, EBP und SERP1 (Spalten 1, 5 und 7) als Interaktionspartner von VKORC1 bestätigt werden konnten.

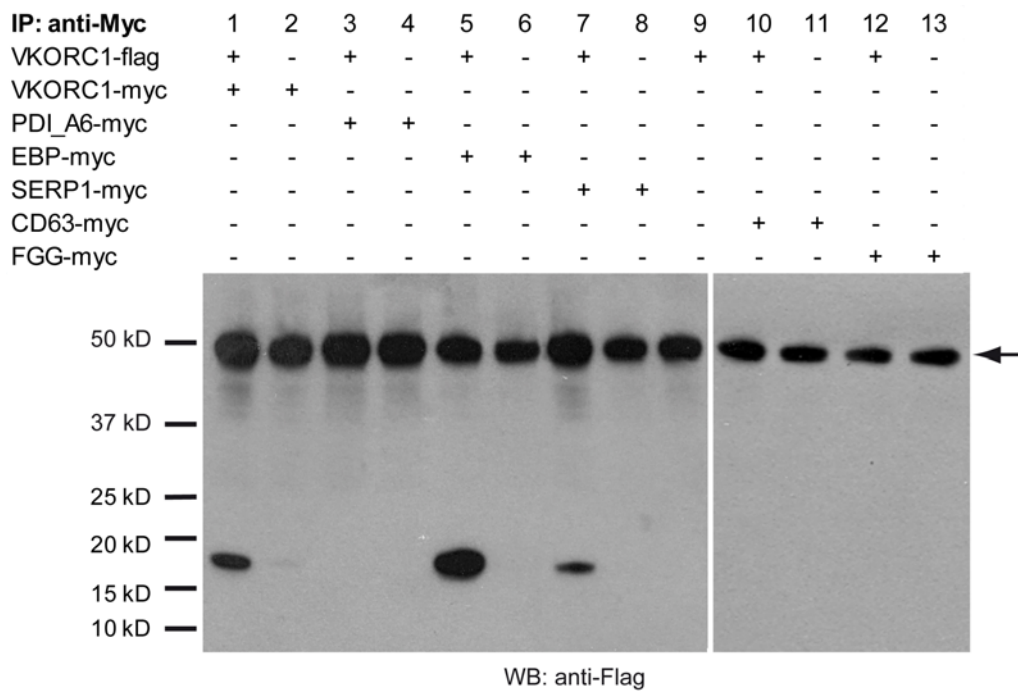


Abbildung 37: **Myc-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner mittels anti-Flag Antikörpers.**

Die VKORC1-Flag Konstrukte (19,3kDa) konnten nach Myc-IP bei Koexpression mit VKORC1-Myc, EBP- Myc und SERP1- Myc mit anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden. PDIA6- Myc, CD63- Myc und FGG- Myc konnten in diesem Assay nicht detektiert werden.

Eine Interaktion mit PDIA6, CD63 und FGG konnten nicht gezeigt werden (Abbildung 37, Spalten 3, 10 und 12).

Als „Gegenprobe“ wurde die Ko-Immunpräzipitation auch mit Flag-Agarose durchgeführt (Flag-IP). Bei der Immunpräzipitation mittels Flag-Agarose wurden VKORC1-Flag-getaggten Konstrukte, äquivalent zu der Myc-IP, isoliert. Falls VKORC1-Flag mit dem jeweiligen Beuteprotein interagiert, sollten diese anschließend auf einem Western-Blot mit Hilfe eines Myc-Antikörpers nachgewiesen werden können. Hierbei konnte die Interaktion von VKORC1 und VKORC1L1 gezeigt werden (Abbildung 38, Spalte 3).

Die bereits in der Myc-IP gezeigten Interaktionen konnten weitestgehend bestätigt werden, wobei die EBP-Bande bei der Flag-IP mit der 25kDa IgG-Bande überschneidet und das SERP1 nur schwach sichtbar war (Abbildung 39, Spalten 8 und 7). Die Interaktion mit den Proteinen PDIA6, FGG und CD63 konnten wiederum nicht gezeigt werden (Abbildung 38, Spalte 6 bzw. leere Blots für FGG und CD63 nicht gezeigt).

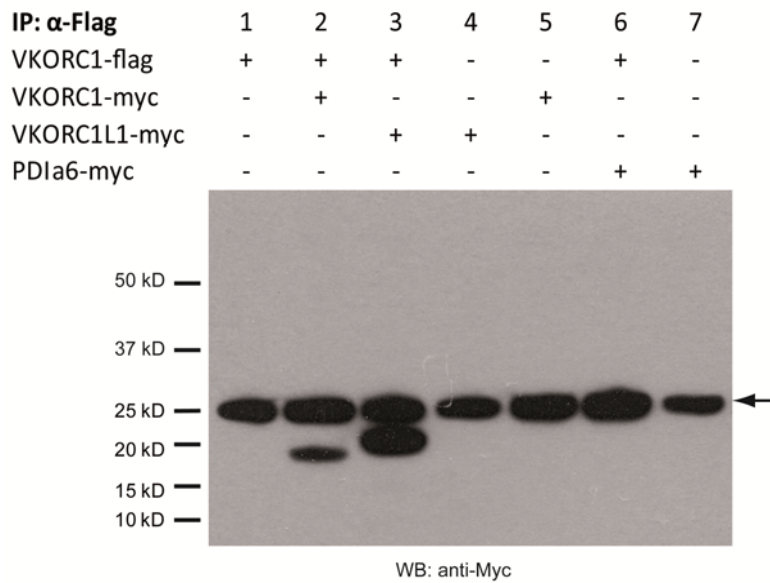


Abbildung 38: **Flag-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner VKORC1, VKORC1L1 und PDIA6 mittels anti-Myc Antikörpers.**

VKORC1 und VKORC1L1 können als Interaktionskandidaten bestätigt werden (Spalte 2 und 3). PDIA6-Myc konnte nach Flag-IP nicht nachgewiesen werden (Spalte 6). Die Negativ-Kontrollen (Spalte 1, 4, 5 und 7), bei denen jeweils mit den leeren Vektoren pcDNA3.1-Flag (Spalte 4, 5 und 7) bzw. pcDNA3.1-MycHis (Spalte 1) coexpressiert wurde, zeigten keine Bande, wodurch man bei VKORC1 und VKORC1L1 von einer Interaktion ausgehen kann.

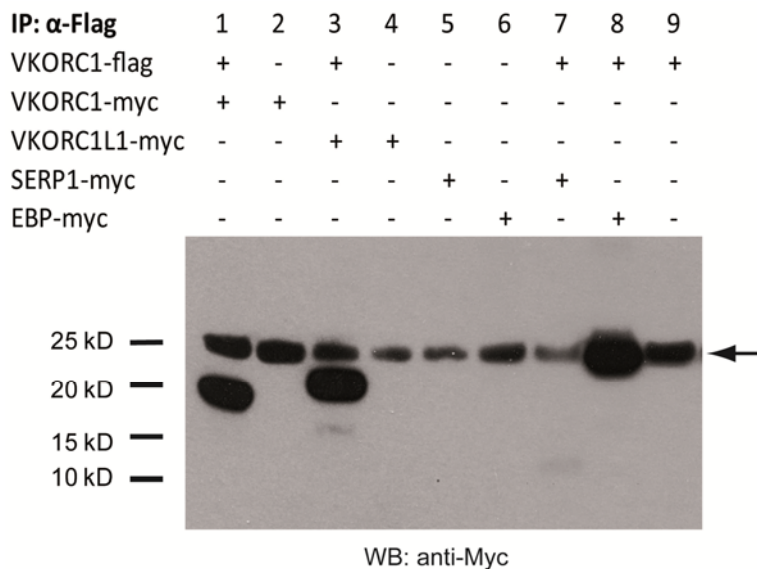


Abbildung 39: **Flag-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner VKORC1, VKORC1L1, SERP1 und EBP mittels anti-Myc Antikörpers.**

VKORC1 und VKORC1L1 wurden erneut als Interaktionskandidaten bestätigt werden (Spalte 1 und 3). SERP1, mit einer Größe von 9,7 kDa auf dem Gel, konnte nur schwach detektiert werden (Spalte 7). EBP, mit der Laufhöhe von 28,65 kDa, überlagert mit der 25 kDa IGG-Bande (Spalte 8, Pfeil). Die Negativ-Kontrollen (Spalte 1, 4, 5 und 7), bei denen jeweils den leeren Vektoren mit pcDNA3.1-Flag (Spalte 2, 4, 5 und 6) bzw. pcDNA3.1-MycHis (Spalte 9) coexpressiert wurde, zeigten keine Bande.

3.4 Kolokalisation von VKORC1 und den möglichen Interaktionspartnern

Eine räumliche Nähe von Proteinen ist Voraussetzung für ihre Interaktion. Deshalb wurde die Kolokalisation von VKORC1 mit den Interaktionskandidaten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Darunter wird verstanden, dass ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen bindet und anschließend ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gerichtet, eingesetzt wird.

VKORC1 konnte mit dieser Technik bereits in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert werden [15].

Für diesen Versuch wurde Flag-getaggtetes VKORC1 jeweils mit einem Myc-getaggten Kandidaten in HeLa koexprimiert. Die Primärantikörper waren gegen die Tags gerichtet und für die Sekundärantikörper wurden verschiedene Alexa Fluor® Fluorochrome ausgesucht. Im Fluoreszenz-Mikroskop konnte die Lokalisation der beiden Proteine mittels Aufsicht-Fluoreszenzmikroskopie und verschiedenen Filtern dargestellt werden.

Um die Spezifität der Alexa Fluor® Farbstoffe zu prüfen, wurde als Kontrolle jede Ko-Expression ohne Primärantikörper gefärbt. Außer bei der VKORC1-FGG-Koexpression band der 488 Goat Anti-Rabbit IgG spezifisch (siehe Abbildung 40). Eine Lokalisation von FGG war daher in der Immunfluoreszenz nicht möglich.

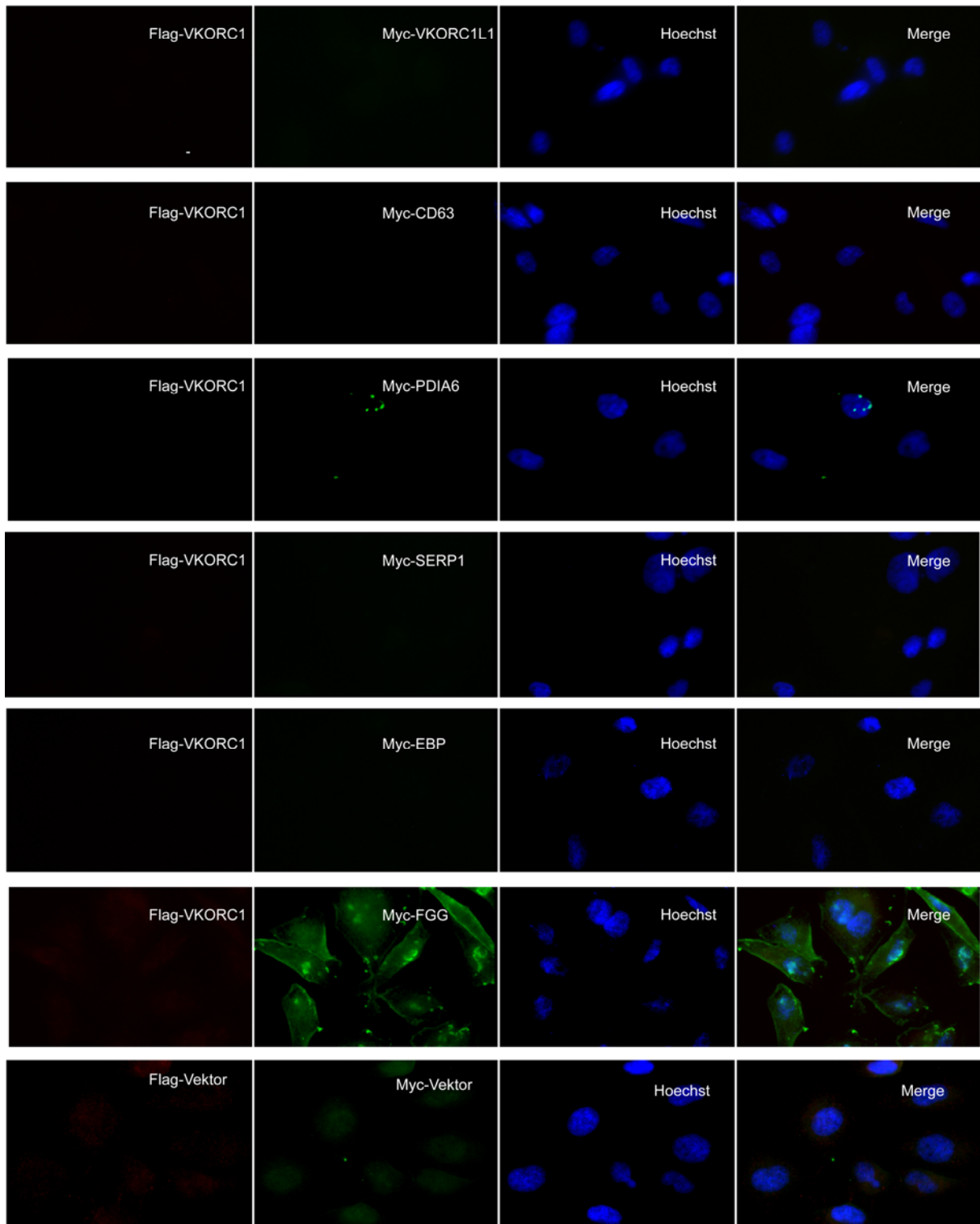


Abbildung 40: **Kolokalisation von VKORC1 mit den Kandidaten ohne Tag-spezifischen primär-Antikörper.**

Es wurden ausschließlich die sekundären Antikörper eingesetzt: Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG, rot, für VKORC1-Flag markiert und Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG, grün, für Myc-getaggte Proteine. Beide Sekundärantikörper binden, außer bei FGG, nicht unspezifisch.

Besonders interessant war die Lokalisation von VKORC1L1, da über die subzelluläre Lokalisation von VKORC1L1 bis dahin nichts bekannt war. Wie in Abbildung 41 zu sehen, sind VKORC1 und VKORC1L1 beide in der ER-Membran lokalisiert.

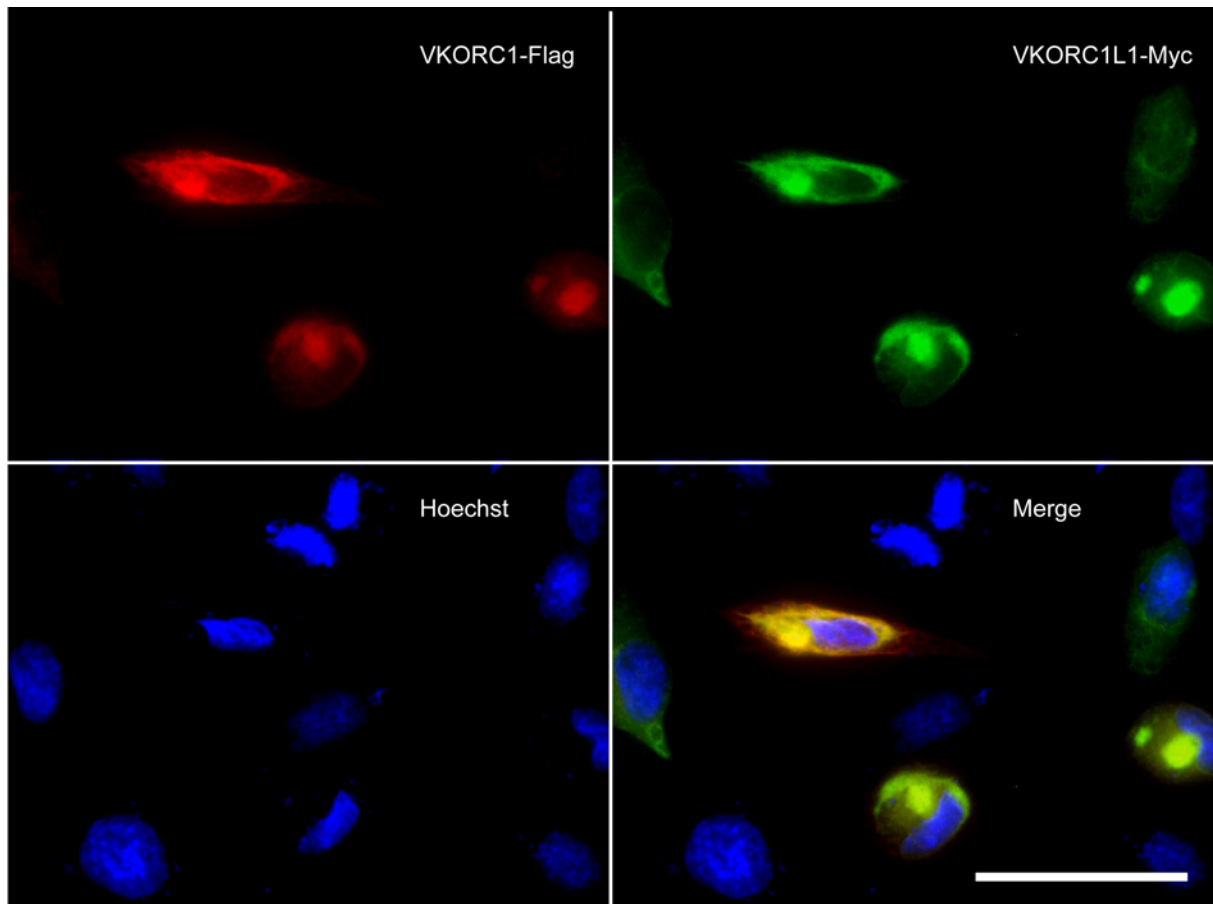


Abbildung 41: **Kolokalisation von VKORC1 und VKORC1L1.**

Die verwendeten Primärantikörper sind jeweils gegen Flag bzw. Myc gerichtet (α -FLAG-M2 anti mouse bzw. α -c-Myc anti rabbit). Als sekundäre Antikörper wurden Alexa Fluor® Farbstoffen verwendet. VKORC1-Flag wurde mit 594 Goat Anti-Mouse IgG rot markiert und VKORC1L1-Myc mit 488 Goat Anti-Rabbit IgG grün. In der Überlagerung (merge) sieht man in gelb, dass beide Proteine in der ER-Membran lokalisiert sind.

Für die subzelluläre Lokalisation der meisten Kandidatenproteine gibt es Hinweise aus der Literatur. So sind EBP [208] und SERP1 [209] in der ER-Membran lokalisiert, PDIA6 [210] im ER-Lumen und CD63 wurde in Lysosomen nachgewiesen [211].

Die Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenz für die Interaktionskandidaten.

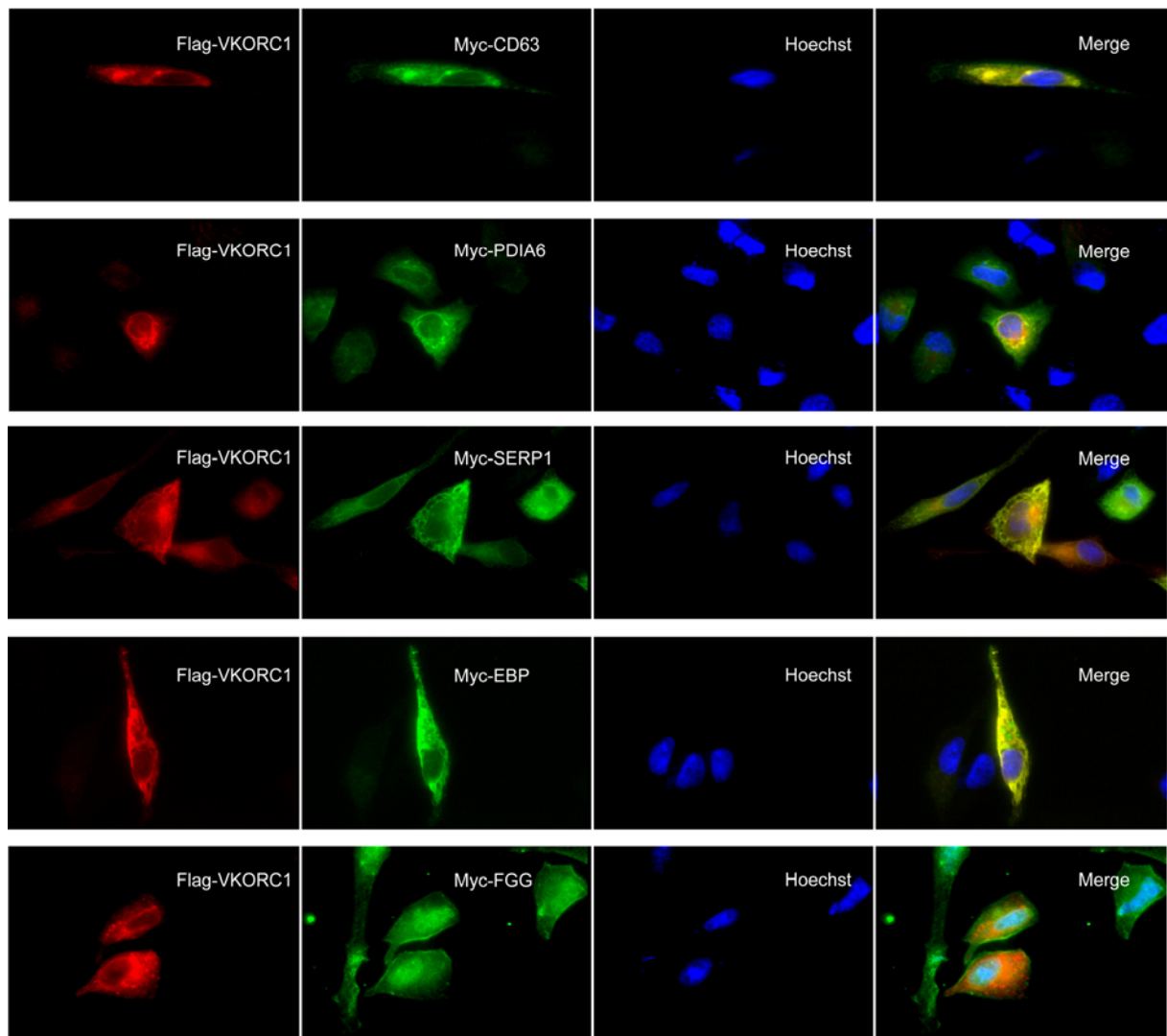


Abbildung 42: **Kolokalisation von VKORC1 und CD63, PDIA6, SERP1, EBP und FG G.**

Die verwendeten Primärantikörper sind jeweils gegen Flag bzw. Myc gerichtet (α -FLAG-M2 anti mouse bzw. α -c-Myc anti rabbit). Als sekundäre Antikörper wurden verwendet: für VKORC1-Flag Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG (rot) und für die Interaktionskandidaten 488 Goat Anti-Rabbit IgG (grün). In der Überlagerung (merge) sieht man eine Mischfarbe (gelb).

Neben den erwarteten Kolokalisationen von VKORC1 mit EBP und SERP1 konnte auch bei PDIA6 und CD63 eine Überlagerung der Expressionsbilder festgestellt werden (Abbildung 42). Dies kann im Fall der PDIA6, die im ER-Lumen beschrieben wurde [210], daran liegen, dass das Prinzip der Aufricht-Fluoreszenzmikroskops verwendet wurde, mit dem nur zweidimensionale und nicht wie mit einem Konfokalmikroskop dreidimensionale Bilder dargestellt werden können.

Im Fall von CD63 gilt das gleiche wie bei der PDIA6, da die Zellen ebenfalls in Aufsicht betrachtet wurden und eine Differenzierung von ER und Lysosomen bei der verwendeten Auflösung nicht möglich war.

FGG konnte nur unspezifisch markiert werden (Abbildung 40). Daher kann über seine Lokalisation keine Aussage getroffen werden.

4. DISKUSSION

4.1 Kinetik von VKORC1L1

Die 50%ige Homologie der beiden VKOR-Proteine, VKORC1 und VKORC1L1, lässt eine ähnliche Proteinstruktur und -funktion vermuten. Hinzu kommen einige hochkonservierte Aminosäuren an homologen Positionen, wie das Cysteinpaar Cys43 und Cys51, Ser51 und das Redox-Motiv Cys132-X-X-Cys135, das eine zentrale Rolle beim Elektronentransfer einnimmt (Positionsangaben der Aminosäuren für VKORC1) [80]. Es kann also vermutet werden, dass die physiologische Funktion von VKORC1L1 ebenfalls im Vitamin-K-Kreislauf zu suchen ist [83].

Bislang ist über die Funktion von VKORC1L1 jedoch nichts Näheres bekannt. Man geht mittlerweile davon aus, dass VKORC1L1 keine Rolle bei der Aktivierung Vitamin K-abhängiger Proteine zu spielen scheint und dass Defekte im VKORC1-Gen durch VKORC1L1 nicht kompensieren werden können. Dafür sprechen folgende Fakten: die inaktivierende Mutation p.Arg98Trp, die bei Patienten mit VKCFD2 beobachtet wurde [15], wird nicht durch das intakte VKORC1L1-Protein kompensiert. Dasselbe gilt für die VKORC1-Knock-out-Mäuse [73]. Ob es im VKORC1L1-Gen Mutationen gibt, wurde weder beim Menschen noch bei Ratten oder Mäusen untersucht, vor allem, weil unklar ist, nach welchem klinischen Phänotyp man suchen sollte. Hinzu kommt, dass VKORC1L1 anscheinend auch keinen Einfluss auf die Warfarin-Dosierung bei oraler Antikoagulation hat [212].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Fähigkeit von VKORC1L1 untersucht werden, die VKOR-Reaktion zu katalysieren. Zu diesem Zweck wurden enzymkinetische Messungen mit den zwei Epoxiden von Vitamin K1 und K2 als Substraten durchgeführt. In den Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass sich VKORC1L1 hinsichtlich des pH-Optimums und der optimalen Konzentration des Detergenz CHAPS von VKORC1 nicht wesentlich unterscheidet (vgl. Abbildungen 15 und 16).

4.1.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Als wichtigstes Ergebnis ist festzuhalten, dass VKORC1L1 beide Epoxide reduzieren kann. Im Vergleich der Michaelis-Menten-Parameter kann festgestellt werden, dass für Vitamin K1-Epoxid als Substrat ein K_M -Wert von $0,787 \pm 0,062 \mu\text{M}$ und eine V_{MAX} von $2,933 \pm 0,037 \text{ nmol/mg/h}$ ermittelt werden konnte (vgl. Abbildung 17), während Messungen mit Vitamin K2-Epoxid einen K_M von $0,473 \pm 0,064 \mu\text{M}$ und eine V_{MAX} von $7,182 \pm 0,473 \text{ nmol/mg/h}$ ergaben (vgl. Abbildung 18). Aufgrund der niedrigeren K_M kann davon ausgegangen werden, dass Vitamin K2-Epoxid eine stärkere Affinität zu VKORC1L1 hat als Vitamin K1-Epoxid und dass die Sättigung mit K2-Epoxid schneller erreicht wird als mit K1-Epoxid. Die 2,4 fach höhere V_{MAX} zeigt eine schnellere Verstoffwechslung von Vitamin K2-Epoxid im Vergleich zu Vitamin K1-Epoxid an.

Stellt man diesen Werten die kinetischen Parameter von VKORC1 gegenüber (vgl. Tabelle 10), ergibt sich, dass das L1-Protein für beide Substrate eine niedrigere K_M und einer höhere V_{MAX} besitzt als das C1-Protein. Es ist daher weniger Substrat zur Sättigung von VKORC1L1 nötig als von VKORC1, wobei beide Formen weniger Vitamin K2-Epoxid als K1-Epoxid zur Sättigung benötigen.

Über die Michaelis-Menten-Gleichung kann zusätzlich eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit getroffen werden ($K_M = \frac{1}{2} V_{\text{MAX}}$, die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit). So kann man feststellen, dass die Bindungsstellen von VKORC1L1 im Vergleich zu VKORC1 schneller gesättigt werden und das Vitamin K-2-Epoxid hierbei deutlich schneller als Vitamin K1-Epoxid mit beiden VKOR-Enzymen reagiert.

Vitamin K2 wird also schneller an VKORC1 und VKORC1L1 gebunden. Dies liegt wahrscheinlich an der Struktur von Vitamin K2. Da Vitamin-K2 in geringerer Menge im Organismus vorhanden ist, könnte dies evolutionär begründet sein. Dies wäre eventuell auch eine Erklärung warum deutlich weniger Vitamin K2 im Stoffwechsel messbar ist, da es durch die höhere Affinität zu VKOR in geringerer Dosis frei im Organismus zirkuliert.

		VKORC1		VKORC1L1	
		VKO1	VKO2	VKO1	VKO2
K_M	[μM]	2,336	1,563	0,787 \pm 0,061	0,473 \pm 0,064
V_{MAX}	[nmol/mg/h]	1,199	1,696	2,933 \pm 0,037	7,182 \pm 0,473

Tabelle 10: **Vergleich VKORC1 – und VKORC1L1-Kinetiken.**

Die Werte von VKORC1 (human, WT) wurden von Milka Marinova, Universität Bonn, ermittelt. Der K_M -Wert gibt die Stabilität von Enzym-Substrat-Komplexen an. Dabei gilt: Je kleiner der K_M , desto stabiler der Komplex. Der V_{MAX} -Wert gibt an wie schnell alle Bindungsstellen des Enzyms gesättigt sind.

Um verschiedene Proteine enzymatisch vergleichen zu können, sind gleiche Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert sowie identische Konzentrationen des Enzyms, der Substrate und der ggf. von Effektoren (Inhibitoren wie Warfarin) Voraussetzung. Die VKORC1-Kinetik von Milka Marinova wurde unter den gleichen Bedingungen (identisches Substrat, gleiches Expressionssystem, gleicher Versuchsaufbau etc.) in Bonn durchgeführt, wodurch diese Werte vergleichbar werden.

Bereits publizierte VKORC1-Kinetikparameter wurden bis dato nur mit Vitamin K1-Epoxid als Substrat an Lebermikrosomen bestimmt. So wurden bereits 1984, lange vor Entdeckung des VKOR-Gens, die VKOR-Reaktion an Lebermikrosomen von Warfarin-resistenten und nicht resistenten Ratten kinetisch untersucht (siehe Tabelle 11) [213]. Wilson verglich 2003 die VKORC1-Aktivitäten verschiedener Spezies mittels kinetischen Untersuchungen an Lebermikrosomen (siehe Tabelle 11) [214]. Die Michaelis-Menten Parameter von warfarin-sensitiven und nicht sensitiven Mäusen wurden 2006 von Lasseur ebenfalls an Lebermikrosomen untersucht (siehe Tabelle 11) [118].

Die bisher publizierten Werte schwanken, bedingt durch unterschiedliche Versuchsbedingungen, erheblich. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit HEK-Zellysate, welche die VKOR-Proteine überexprimieren, anstelle von Lebermikrosomen für die Kinetik verwendet wurden.

	VKORC1 (Ratten-Lebermikrosomen) Hildebrand et al. 1984		VKORC1 (Lebermikrosomen) Wilson et al. 2003		VKORC1 (Maus-Lebermikrosomen) Lasseur et al. 2006	
	VKO1 (WT)	VKO1 (mut)	VKO1 (Ratte)	VKO1 (Mensch)	VKO1 (WT)	VKO1 (W59G)
K_M [μM]	9	4	$4,25 \pm 0,40$	$3,09$ (ohne S.E.)	$12,73 \pm 0,93$	$15,31 \pm 4,92$
V_{MAX} [nmol/mg/h]	3000	750	$33,5 \pm 1,0$	$53,1$ (ohne S.E.)	$0,32 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,01$

Tabelle 11: **Publizierte VKORC1-Kinetik-Parameter.**

K_M als auch V_{MAX} schwanken erheblich zwischen den verschiedenen Messungen. Es wurde ausschließlich der Umsatz des Vitamin K1-Epoxids untersucht.

Ein direkter Vergleich mit den hier ermittelten Werten für die rekombinant exprimierten Proteine ist nicht sinnvoll, da die Reaktionsbedingungen sich vermutlich erheblich unterscheiden. Da es sich um eine membran-gebundene Enzymreaktion handelt, ist sowohl bei der Verwendung von Lebermikrosomen als auch bei der rekombinanten Expression der Zusatz eines Detergenz (CHAPS) notwendig, wodurch die physiologischen Bedingungen zerstört werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass VKORC1L1 eine höhere Affinität zu beiden Vitamin K-Epoxiden besitzt als VKORC1, wobei das Vitamin K2-Epoxid von beiden VKOR-Proteinen stabiler gebunden und schneller verstoffwechselt wird als Vitamin K1.

4.1.2 Wirkung von Warfarin auf die VKORC1L1-Aktivität

Zusätzlich zu den Michaelis-Menten-Parametern sollte die Wirkung von Warfarin auf VKORC1L1 untersucht werden. Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass die Reduktase-Aktivität von VKORC1L1 durch Warfarin *in vitro* gehemmt werden konnte.

Bei Hemmstudien enzymatischer Reaktionen gibt der IC_{50} -Wert die Konzentration eines Inhibitors an, der zu einer Hemmung des Reaktionsumsatzes um 50% führt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Konzentration soll allgemein bei einer Substratkonzentration gemessen werden, die der K_M entspricht. Das wären ca. $0,8 \mu\text{M}$ für VKO1 bzw. ca. $0,5 \mu\text{M}$ für VKO2. Bei diesen Substratkonzentrationen konnten jedoch keine signifikanten Umsätze erzielt werden. Daher wurden die Hemmstudien mit $8 \mu\text{M}$ VKO1 bzw. VKO2 für VKORC1L1 durchgeführt.

In dieser Arbeit betrug die 50%ige Hemmung von VKORC1L1 mit VKO1 als Substrat 20,20 μM und mit VKO2 als Substrat 4,06 μM . Dies entspricht jedoch der Bestimmung der „echten“ IC_{50} -Werte, weil dafür die Substratkonzentration im Ansatz gleich dem K_M -Wert sein muss. Man kann allerdings anhand der Daten vermuten, dass die Hemmwirkung nicht unabhängig vom verwendeten Substrat ist (siehe Tabelle 12). Bei 8 μM Vitamin K1-Epoxid brauchte man 20,2 μM Warfarin um die Aktivität um 50% zu halbieren, während bei 8 μM Vitamin K2-Epoxid nur 4,06 μM Warfarin für die Halbierung der Aktivität notwendig war.

	VKORC1L1	
	8 μM VKO1	8 μM VKO2
KM (μM)	0,787	0,473
Verdünnungsfaktor (8μM/KM)	10,17	16,91
50%ige Hemmung (μM)	20,20	4,06
50%ige Hemmung/KM	25,67	8,58
„IC_{50}“ = 50%ige Hemmung / Verdünnungsfaktor	1,99	0,24

Tabelle 12: **Berechnete IC_{50} -Werte.**

In der Hemmstudie wurde statt 0,787 μM VKO1 und 0,473 μM VKO2 von beiden Substraten 8 μM in den Versuch eingesetzt. Das entspricht bei VKO1 einem Faktor von 10,71 und bei VKO2 16,91. Die experimentell ermittelten Hemmwerte für eine 50%ige Hemmung der VKORC1L1-Aktivität lagen bei VKO1 als Substrat 20,2 μM und bei VKO2 als Substrat bei 4,06 μM . Die Hemmung bezogen auf den K_M betrug bei VKO1 25,67 und bei VKO2 8,58 was auf eine leichtere Hemmung von Warfarin bei VKO2 als Substrat schließen lässt. Würde man anhand dieser Daten den IC_{50} -Wert von Warfarin auf VKORC1L1 berechnen läge er für VKO1 um die 1,99 μM und für VKO2 bei ca. 0,24 μM . Dies ist jedoch NICHT der IC_{50} -Wert, da die eingesetzte Substratmenge nicht gleich dem K_M war.

Die bis dato veröffentlichten IC_{50} -Werte schwanken erheblich. Dies ist bereits durch die massiv unterschiedlichen K_M -Werte erklärbar. So wurde für humane Lebermikrosomen ein IC_{50} -Wert von 0,18 μM beschrieben [214]. In Ratten-Lebermikrosomen wurden IC_{50} -Werte von 0,07 μM [214] bis 2 mM [14] bei Warfarin-sensitiven Ratten gemessen und bei Warfarin-resistenten Ratten wurden sogar Werte von 5 mM angegeben [14]. Daran sieht man, dass enzym-kinetische Daten je nach Versuchsbedingungen extrem schwanken. Hinzu kommt, dass bisher nicht zwischen Vitamin K1- und Vitamin K2-Epoxid unterschieden wurde. Standardmäßig wurde nur der Umsatz an Vitamin K1 gemessen.

In der Literatur wurde vermutet, dass es sich bei Warfarin um einen kompetitiven Inhibitor handelt, was bedeutet, dass Warfarin mit dem Substrat um die gleiche Bindestelle konkurriert [215]. Aufgrund der hohen Struktur-Analogie erscheint das plausibel (siehe Abbildung 43).

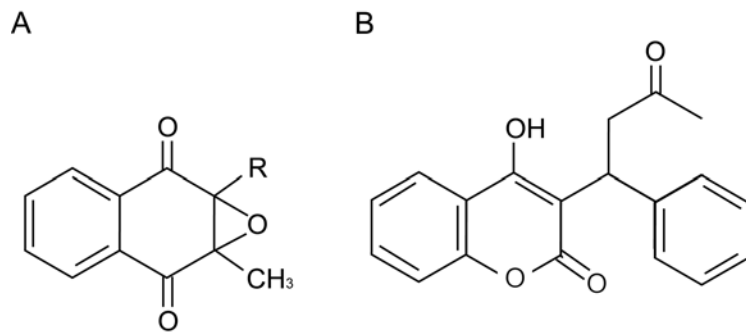


Abbildung 43: **Strukturvergleich des Vitamin K und des Inhibitors Warfarin.**

A: Struktur von Vitamin K-Epoxy; B: Struktur von Warfarin

Bei kompetitiver Inhibition gilt folgende Beziehung zwischen IC_{50} , K_{IC} und K_M -Wert:

$$IC_{50} = (1 + [S]/K_M) \times K_{IC}$$

Dies bedeutet, wenn K_M bekannt ist und eine Messreihe mit $[S] = K_M$ und variierenden Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt wird, kann IC_{50} empirisch ermittelt und daraus dann K_{IC} wie folgt berechnet werden:

$$K_{IC} = IC_{50} / 2.$$

Da hier allerdings $[S] \neq K_M$ war, konnte der K_{IC} nicht berechnet werden.

Die Hemmung wurde zusätzlich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Hierbei war festzustellen, dass die Hemmwirkung bei steigender Inkubationszeit nicht signifikant zunahm. Die Inkubationszeit scheint keinen Einfluss auf das $ES \leftrightarrow EI$ -Gleichgewicht zu haben, was für eine reversible Hemmung durch Warfarin spricht.

4.1.3 Mutagenesestudien

Ein großer Teil der derzeitigen Kenntnisse über die Funktion des VKORC1-Proteins stammt aus der Untersuchung von natürlichen Mutationen wie sie bei Warfarin-resistenten Patienten oder Nagetieren beobachtet worden waren. Weitere Informationen haben gezielte Mutagenese-Experimente geliefert. Äquivalent zu Mutagenesestudien an VKORC1, wurde in Rahmen dieser Arbeit die VKR-Aktivität von VKORC1L1 nach dem Austausch einzelner Cysteine untersucht.

Vergleicht man die VKORC1-Mutagenese, die 2005 von Rost et al. publiziert wurden [207], mit den eigenen Ergebnissen der VKORC1L1-Mutagenesestudie, so kann man feststellen, dass durch den Austausch der Cysteine an den Positionen 16, 43, 51, 132 und 135 im VKORC1 bzw. der homologen Stellen 23, 50, 28, 139 und 142 im VKORC1L1 jeweils durch ein Serin die Aktivität beider Proteine nahezu vollständig aufgehoben wurde. Die Aktivitäten von VKORC1 und VKORC1L1 verhielten sich nach Austausch der Cysteine nahezu identisch (siehe Abbildung 44 und 45).

Dies untermauert die große Homologie zwischen den beiden Proteinen und stützt die vorhergesagte Topologie des VKORC1L1-Proteins (siehe Abbildung 6).

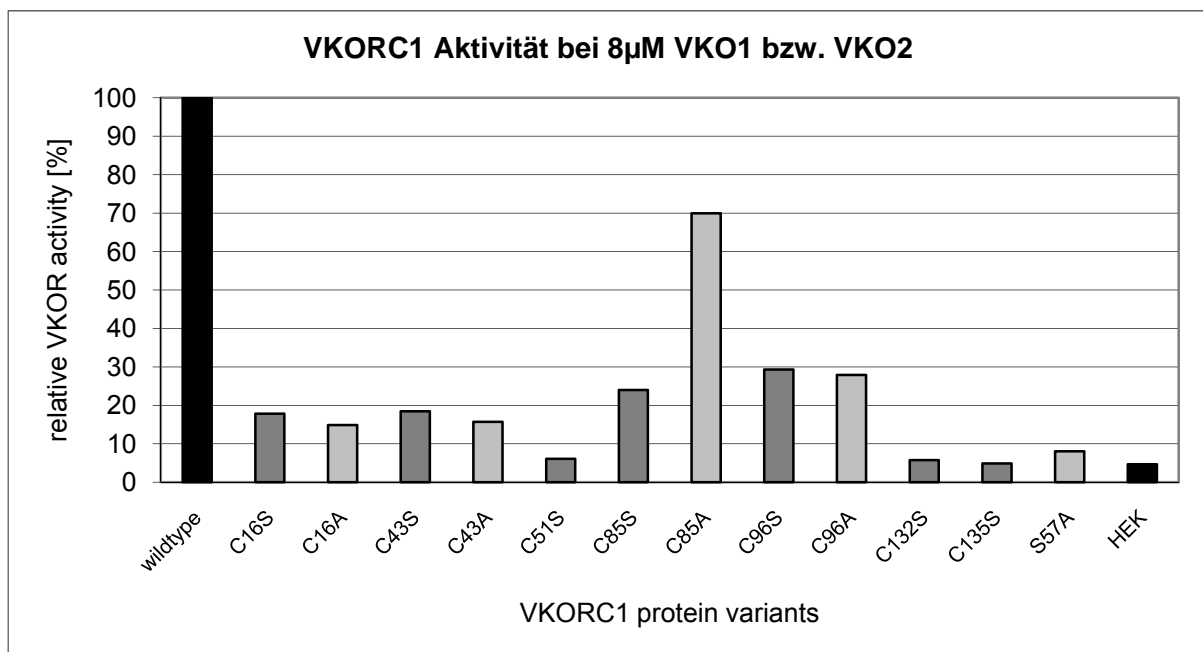


Abbildung 44: **VKORC1-Mutagenesestudie (Rost et al. 2005)**

Die aufgelisteten Cysteine (C) im VKORC1 wurden wie angegeben gegen Serin (S) bzw. Alanin (A) ausgetauscht. Die Aktivität des Wildtyps (WT) wurde auf 100% gesetzt. Die basale VKORC1-Aktivität der nicht transfizierten HEK-Lysate ist im rechten Balken angezeigt (HEK). Die Restaktivität der Mutationen C51S, C132S, C135S und S57A ist von der der nicht transfizierten nicht verschieden.

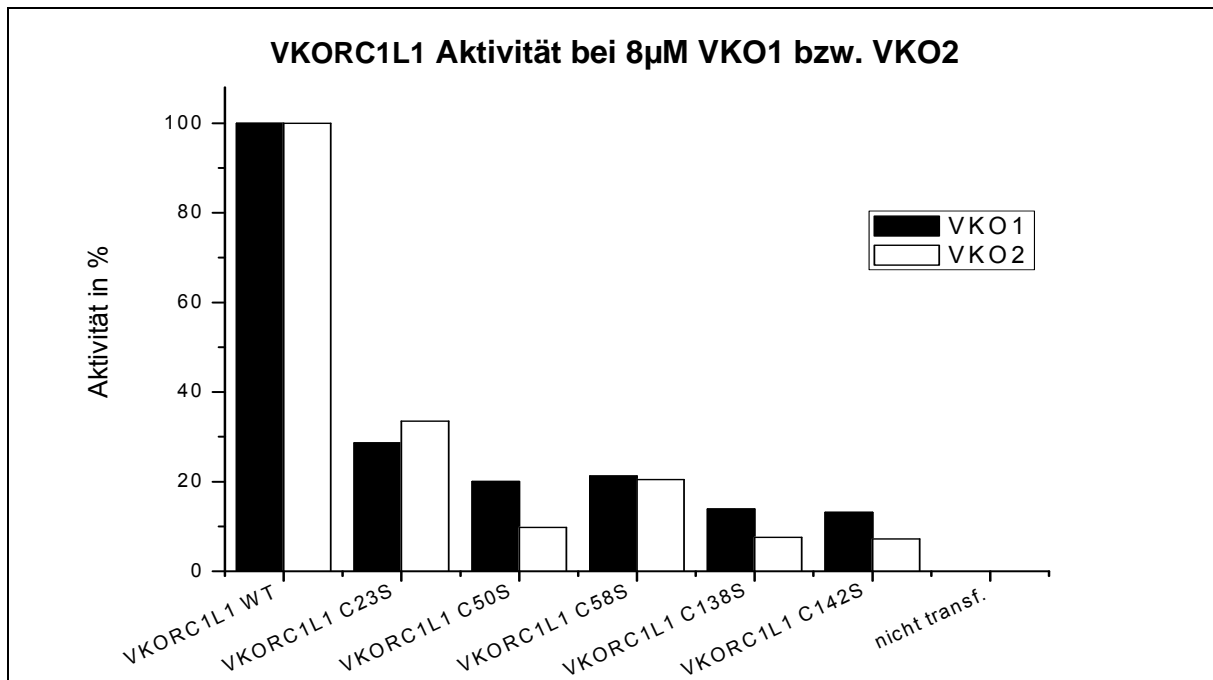


Abbildung 45: **VKORC1L1-Mutagenesestudie**

Die aufgelisteten Cysteine (C) in VKORC1L1 wurden wie angegeben gegen Serin (S) ausgetauscht. Die Aktivität des Wildtyps (WT) wurde auf 100% gesetzt. Eine enzymatische Aktivität der nicht transfizierten HEK-Lysate konnte nicht gemessen werden (rechter Balken: „nicht transf.“).

Durch alle Cystein gegen Serin-Austausche wurde die Aktivität um 70 bis über 90% gehemmt.

4.2 Proteininteraktionen

Durch Interaktionen von Proteinen entstehen zeitlich und räumlich variable Komplexe, wodurch es der Zelle ermöglicht wird, ihre Funktionen auszuführen und sich veränderten äußeren Bedingungen anzupassen. Dies spielt bei fast allen zellinternen Prozessen eine Rolle.

Bei Protein-Protein-Interaktionen handelt es sich um die Wechselwirkung zweier oder mehrerer Proteine. Diese Interaktionen geschehen meist spezifisch an bestimmten Domänen über nicht-kovalente Wechselwirkungen von Aminosäuren. Als Folge kann es zu einer Konformationsänderung beider oder nur eines der beiden Proteine kommen, was wiederum meist eine Funktionsänderung zur Folge hat (z.B. Aktivierung oder Deaktivierung).

Die physiologische Funktion eines Proteins kann daher durch Interaktionspartner wesentlich beeinflusst werden, so dass für das vollständige Verständnis der Funktion(en) eines Proteins auch die Identifizierung der interagierenden Proteine wichtig ist. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit nach neuen Interaktionspartnern der paralogen VKOR-Proteine, VKORC1 und VKORC1L1 sowie der γ -Glutamyl-Carboxylase gesucht werden.

Da es sich bei diesen drei Proteinen um membranständige Proteine handelt, kamen Screening-Methoden wie das klassische Yeast-two-Hybrid-System nicht in Frage. Als Methode der Wahl, um neue Interaktionskandidaten zu finden, wurde daher das Split-Ubiquitin-System verwendet (siehe Abschnitt 1.6.1). Dieses System stellt eine hypothese-freie Möglichkeit dar, nach Interaktionspartnern zu suchen, weil keine Vorauswahl nach funktionellen Gesichtspunkten getroffen wird, sondern sich die Suche (theoretisch) auf alle Gene/Proteine des Zielorgans (hier Leber) erstreckt.

Die Grenzen des Systems liegen zum Einen in der Unvollständigkeit der c-DNA-Klonbank, die mit ca. $1,5 \times 10^6$ humanen Genfragmenten (mit durchschnittlich 1,3 kb Länge) natürlich nur einen Teil der angenommenen 30.000 Gene des Menschen abdeckt [216]. Zum Anderen liegt eine Begrenzung auch in der Sensitivität des Systems. So werden regelmäßig falsch positive Klone detektiert, was eine sogenannte Einzelklon-Analyse erforderlich macht (siehe Abschnitt 3.2.3). Genauso wie in allen anderen Interaktions-Such-Verfahren falsch-positive Klone unter den Treffern sind, werden allerdings auch nicht alle „wirklichen“ Interaktionen gefunden. [217,218]

4.2.1 VKORC1 Interaktionspartner

Wie der Name schon besagt, geht man bisher davon aus, dass die VKOR-Reaktion von einem Komplex aus mehreren Proteinen katalysiert wird. Die einzige bisher bekannte Komponente des Komplexes ist das Protein „Vitamin K-Epoxidreduktase-Komplex 1“ (VKORC1), welches *in vitro* alleine die beiden Reduktionsschritte vom Vitamin K-Epoxid hin zum Vitamin K-Hydrochinon katalysieren kann [15]. VKORC1 hat also sowohl eine Epoxidase- als auch eine Chinon-Reduktase-Aktivität.

Ferner postulierte die Arbeitsgruppe um Wallin als Elektronendonator der VKORC1 eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), erwähnte allerdings nicht, um welches Mitglied der PDI-Proteinfamilie es sich handelt [75]. Schulman et al. zeigten kürzlich, dass es sich bei den Elektronen übertragenden, „thioredoxin (Trx)-like“ Proteinen um PDIA16 und TMX handelt [74].

Weitere Proteine wurden als mögliche Mitglieder des VKOR-Komplexes diskutiert, darunter sind u.a. die γ -Glutamyl-Carboxylase und Calumenin (siehe Abbildung 46).

Bekannte und vorhergesagte Protein-Interaktionen sind unter <http://string-db.org> (STRING= Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) gelistet. Einige Interaktionskandidaten, die unter VKORC1 gespeichert sind, sind in Abbildung 46 aufgeführt.

Vorhergesagte Interaktionspartner von VKORC1		Nachbarschaft	Gen Fusion	Zusammentreffen	Koexpression	Experimentell	Datenbank	aus Literatur	[Homologie]	Score
GGCX	Vitamin K-dependent gamma-carboxylase (EC 6.4.-.-) (Gamma-glutamyl carboxylase)								• •	0,995
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (EC 1.6.5.2) (Quinone reductase 1)								• •	0,945
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9 (EC 1.14.13.80) ((R)-limonene 6-monooxygenase) (EC 1.14.13.48)								•	0,920
EPHX1	Epoxide hydrolase 1 (EC 3.3.2.9) (Microsomal epoxide hydrolase)								•	0,903
F2	Prothrombin precursor (EC 3.4.21.5) (Coagulation factor II)								•	0,849
F7	Coagulation factor VII precursor (EC 3.4.21.21) (Serum prothrombin conversion accelerator)								•	0,807
PROC	Vitamin K-dependent protein C precursor (EC 3.4.21.69) (Autoprothrombin IIA)								•	0,798
PMF1	Polyamine-modulated factor 1 (PMF-1)								•	0,785
F9	Coagulation factor IX precursor (EC 3.4.21.22)								•	0,746
CYP4F2	Cytochrome P450 4F2 (EC 1.14.13.30) (CYP4F2)								•	0,740

Abbildung 46: **Liste der vorhergesagten VKORC1-Interaktionskandidaten.** (STRING, Version 8.3) Der angegebene Score basiert auf allen Angaben zu den 8 genannten Kategorien (Nachbarschaft bis Homologie) und berücksichtigt ausschließlich publizierte Hypothesen bzw. Computer-Vorhersagen.

Da VKORC1 als ein elementarer Bestandteil des Komplexes gilt, wurde in dieser Arbeit zunächst versucht, mit VKORC1 als Köderprotein weitere Komponenten des Komplexes zu finden, und darüber den VKOR-Mechanismus besser zu verstehen.

Mit dem Köder VKORC1 wurden mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems 90 mögliche Interaktionskandidaten aus einer cDNA-Bank von ca. 1,5 Millionen Klonen gefischt (siehe Tabelle 6). Als erstes Ergebnis dieses Screenings ist festzuhalten, dass keines der in der Literatur diskutierten vorhergesagten Kandidatenproteine mittels des Split-Ubiquitin-Systems bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 46 und Tabelle 6). Dies bedeutet natürlich nicht, dass diese Proteine nicht doch zu dem Komplex gehören, sondern nur, dass mittels des verwendeten Systems diese Hypothesen nicht bestätigt werden konnten. Darüber hinaus bedeutet es auch, dass für das Split-Ubiquitin-System keine Positiv-Kontrolle zu Verfügung stand.

Aus den ursprünglich 90 Kandidaten wurden aufgrund ihrer Trefferhäufigkeit im Screen sowie ihren Eigenschaften sechs Proteine ausgewählt und diese Interaktionen weiter untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1.1 bis 4.2.1.7).

4.2.1.1 VKORC1 – VKORC1

Die Tatsache, dass VKORC1 sich selbst achtmal im Ubiquitin-Screen gefunden hat (siehe Tabelle 6), ließ vermuten, dass VKORC1 mindestens Homodimere bildet.

Homokomplexe sind häufig permanente Komplexe, während Heterokomplexe permanent oder transient sein können [219] Demnach wäre die Interaktion von Homomultimeren mittels Ko-Immunpräzipitation leichter nachzuweisen als mit anderen Proteinen.

Die Interaktion von VKORC1 mit sich selbst konnte mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.3), wobei aufgrund der verwendeten denaturierenden Bedingungen die Stöchiometrie nicht geklärt werden konnte, es also derzeit offen bleiben muss, ob es sich hierbei um eine Bildung von Homodimeren, -trimeren, -tetrameren etc. handelt. Daher können keine Angaben zum Typ der Protein-Protein-Interfaces gemacht werden.

Was die Funktion des VKORC1-Homodimers angeht, z.B. ob das Homodimer als Kontext-spezifischer Koaktivator dient, gibt es noch keine Erkenntnis.

4.2.1.2 VKORC1L1 – VKORC1

Als zweites Kandidatenprotein wurde VKORC1L1 aufgrund seiner hohen Homologie zu VKORC1, wegen seiner Reduktase-Aktivität (siehe Abschnitt 4.1) sowie wegen der Treffer im VKORC1L1-Screen (siehe Abschnitt 3.2.2) als möglicher Interaktionskandidat näher untersucht.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass VKORC1L1 mit VKORC1 im Einzellklon-Interaktionstest sowie in der Ko-Immunpräzipitation interagiert. Zusätzlich konnte VKORC1L1 mittels indirekter Ko-Lokalisation in der ER-Membran lokalisiert werden.

Nachdem über VKORC1L1 zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war, ist der Nachweis einer Proteininteraktion von VKORC1 und VKORC1L1 ein potentiell interessanter Aspekt für die Funktion der VKORC1L1.

Hinzu kommt, dass man aufgrund phylogenetischer Betrachtungen mittlerweile davon ausgeht, dass es sich bei der VKORC1L1 um das „ursprünglichere“ Protein handelt, welches eine weniger spezialisierte Rolle im Organismus spielt als VKORC1 [82] (siehe Abbildung 49). Nach Schwarz et al. haben sich die C1- und L1-Gene seit ca. 550 Millionen Jahren getrennt voneinander entwickelt [82]. Die VKORC1-Familie hat in Vertebraten die hoch-spezialisierte Funktion im VKOR-Zyklus als „Hilfsenzym“ der γ -Carboxylierung übernommen, während die VKORC1L1-Proteine sich in allen Phyla finden lassen und möglicherweise also bei der ursprünglichen Funktion geblieben sind.

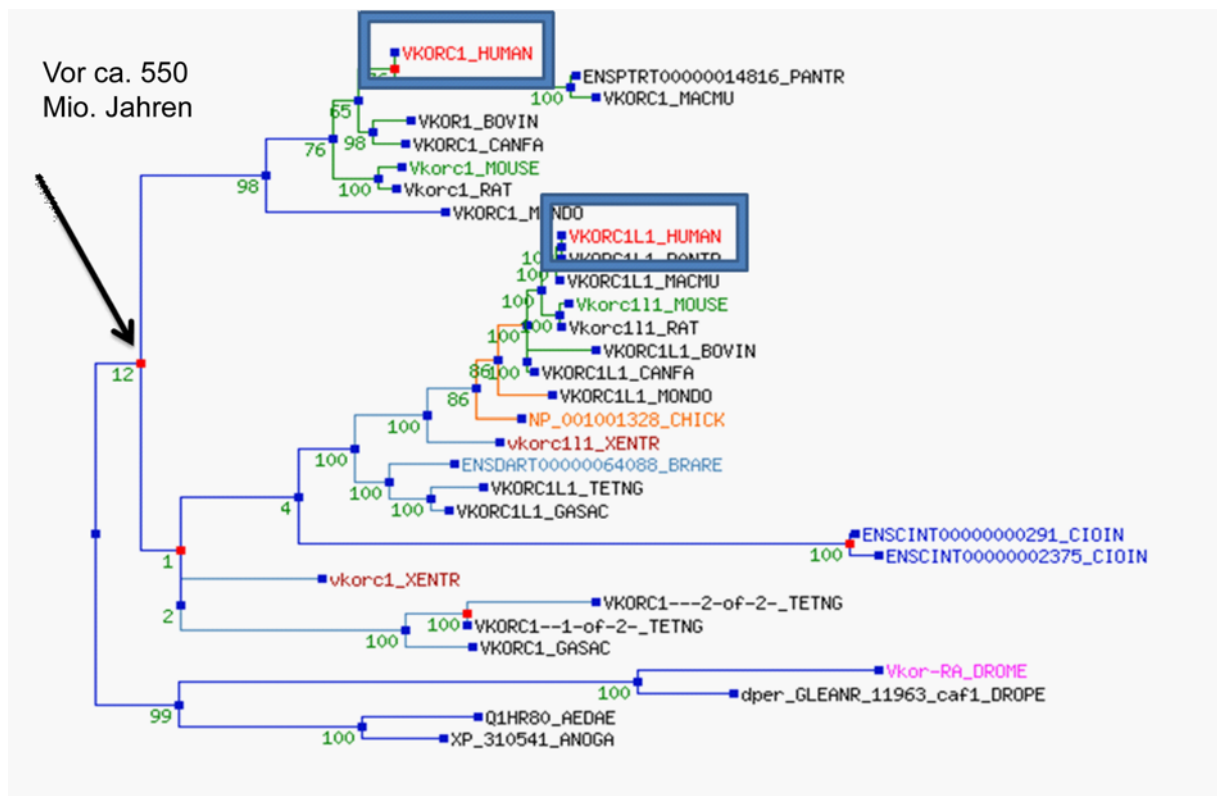


Abbildung 47: **Phylogenetischer Baum der VKOR-Familie** (Schwarz et al. 2009).

Vor ca. 550 Millionen Jahren trennte sich VKORC1 und VKORC1L1. Die Zahlen an den jeweiligen Verzweigungen des Stammbaums sind die Scores für den Konservierungsgrad der Proteine.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass VKORC1L1, ebenso wie die VKORC1, besonders stark in der Leber exprimiert wird [83], was auch für eine „echte“ Interaktion sprechen könnte.

Hepatocyten enthalten im Vergleich zu anderen Zellen besonders viel glattes ER. Die Enzyme des glatten ERs tragen wesentlich zur chemischen Modifikation und Entgiftung toxischer Verbindungen, wie Pestizide oder Carcinogene, bei. Daher sind die Forschungsergebnisse von Hirode et al. hoch interessant, die zeigen, dass das Expressionsprofil der VKORC1L1 in Rattenlebern nach Behandlung mit verschiedenen hepatotoxischen Substanzen deutlich erhöht war, während kein Effekt auf die VKORC1-Expression messbar war [220] (siehe Abbildung 50).

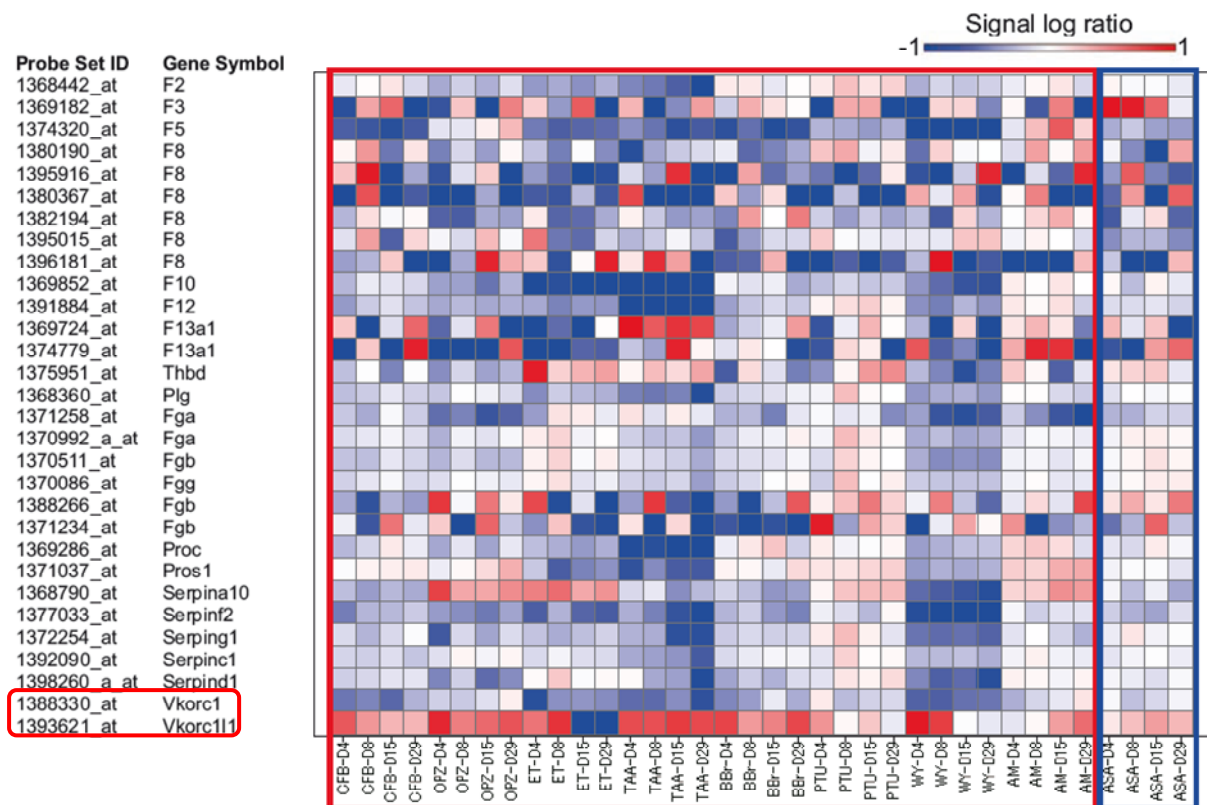


Abbildung 48: Einflüsse hepatotoxischer Medikamente auf die Expression von verschiedenen Genen der Blutgerinnung (Hirode et al. 2009).

Die Signal log ration gibt an gibt den Expressionsgrad (-1 keine Expression, +1 starke Expression). Man sieht deutlich das VKORC1 und VKORC1L1 unter Einfluss hepatotoxischer Medikamente unterschiedliche stark exprimiert werden.

Westhofen et al. beschrieb kürzlich, dass VKORC1L1 zusammen mit Vitamin K als zellulärer Schutzmechanismus vor oxidativem Stress fungiert. U.a. wurde die mRNA-Konzentration von VKORC1 und VKORC1L1 nach H_2O_2 -Inkubation gemessen wurde, wobei die VKORC1L1-mRNA-Konzentration zunahm und die VKORC1-mRNA-Konzentration abnahm [221]. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass Vitamin K-Hydrochinon als Radikalfänger 30 x effektiver ist als Vitamin E [222] und Vitamin K neuroprotektive Eigenschaften besitzt [223].

Wenn man VKORC1L1 - wie von Westhofen beschrieben - eine Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress zuordnet, könnte die Interaktion mit VKORC1 auch in diesem Zusammenhang sinnvoll sein [221].

Trotz der Ähnlichkeiten in der VKOR-Kinetik ist es dagegen eher unwahrscheinlich, dass beide Proteine, VKORC1 und VKORC1L1, Komponenten des Vitamin K-Reduktase-Komplexes sind und VKORC1L1 ebenfalls an der Reduktion von Vitamin K Epoxid beteiligt ist. Dagegen

sprechen vor allem die Beobachtungen, dass ein funktioneller Ausfall von VKORC1 *in vivo* nicht durch VKORC1L1 kompensiert werden kann. Sowohl Patienten mit der VKCDF2-Erkrankung als auch VKORC1-Knock-out Mäuse haben spontane Blutungen [15,73,224]. Die unverändert intakten VKORC1L1-Gene können also den Gendefekt im C1-Gen nicht kompensieren.

Als letzte Möglichkeit muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Interaktion zwischen den beiden VKOR-Proteinen durch ihre hohe Struktur-Homologie sowie durch die Überexpression in HEK-Zellen ausschließlich strukturell bedingt sein könnte und keine physiologische Funktion widerspiegelt.

Neben den Daten dieser Arbeit sprechen also auch einige andere Evidenzen für eine physiologische Interaktion zwischen VKORC1 und -L1. Inwieweit die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion jedoch von realer Bedeutung ist, muss noch durch weitere Experimente gezeigt werden.

4.2.1.3 SERP1 – VKORC1

Als dritter Kandidat wurde das Stress-assoziierte Endoplasmische Retikulum Protein 1 (SERP1) näher untersucht. SERP1 ist auch bekannt als Ribosome-attached membrane protein 4 (RAMP4) und ist ein Typ IV-Membranprotein im Endoplasmatischen-Retikulum.

Auf funktioneller Ebene interagiert SERP1 mit anderen ER-Proteinen und schützt sie vor einer Degradierung als Reaktion auf zellulären Stress. Eventuell unterstützt SERP1 zusätzlich die Glycosylierung von Proteinen und reguliert gegebenenfalls die Verwendung der N-glycosylierten Seite von Proteinen. Bekannt ist ferner, dass SERP1 mit dem SEC61-Komplex, einer zentralen Komponente des eukaryontischen ER-Translokationsapparates und Calnexin interagiert [225-227]. Über eine Interaktion von SERP1 mit VKORC1 war bis dato nichts bekannt.

Da SERP1 ungefaltete Proteine vor Degradierung durch ER-Stress während ihrer Translokation in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums schützt [225], könnte dies auch ein Grund für die Interaktion mit VKORC1 sein. Sauerstoffradikale oder andere reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species; ROS genannt), werden im Rahmen des aeroben Metabolismus, wie z.B. bei der Oxidation der PDI durch Ero1, intrazellulär und extrazellulär freigesetzt (siehe

Abbildung 51) [228]. Durch ihre hochreaktiven Eigenschaften können ROS Proteine, Lipide oder auch die DNA der Zellen schädigen können [221,229].

Der Fokus auf die Interaktion von SERP1 und VKORC1 in dieser Arbeit basiert zum einen darauf, dass SERP1 einer der häufigsten Treffer bei beiden VKOR-Screens war, der auch durch Ko-Immunpräzipitation verifiziert werden konnte. Auch konnte die subzelluläre Lokalisation im ER bestätigt werden. Zum anderen ist SERP1 auch funktionell ein interessanter Kandidat, welcher die VKOR-Proteine vor Oxidation, z.B. durch das stabile Wasserstoffperoxid H_2O_2 schützen könnte, welches unter anderem bei der Oxidation der PDI entsteht. Eine erste Modellvorstellung hierzu zeigt Abbildung 51.

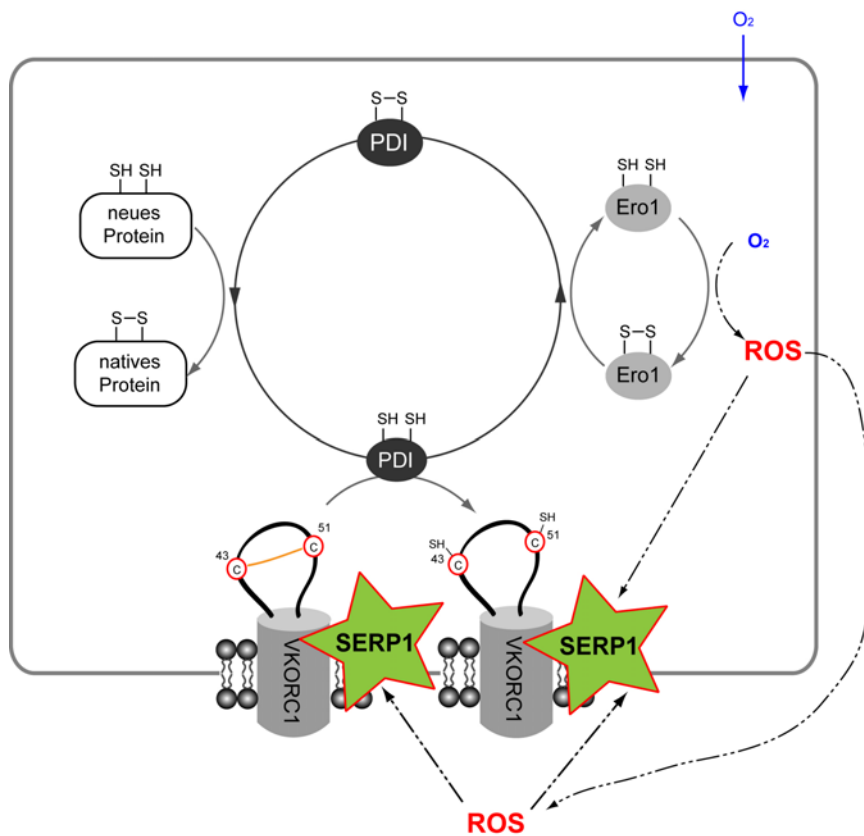


Abbildung 49: **Modell der SERP1 - VKORC1 Interaktion.**

Durch die Interaktion von VKORC1 und SERP1, könnte VKORC1 intrazellulär und extrazellulär vor ROS (in diesem Fall H_2O_2) geschützt werden.

Die Interaktion und weitere funktionelle Einzelheiten müssen in weiteren Versuchen noch geklärt werden. So könnte man zum Beispiel untersuchen, wie die Aktivierung Vitamin K-abhängiger Proteine unter ROS Einfluss verläuft und ob eine Überexpression von VKOR-Proteinen oder SERP einen schützenden Effekt hätte.

4.2.1.4 EBP – VKORC₁

Das Emopamil Binding Protein (EBP) war ein weiterer häufiger Treffer im Split-Ubiquitin-Screen. EBP ist auch bekannt als CPX; CHO2; CPXD bzw. CDPX2 und ist ebenfalls ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums [186]. Die Interaktion konnte durch beide Methoden, Split-Ubiquitin-System und Ko-Immunpräzipitation belegt werden. Auch die schon bekannte Lokalisation im ER konnte durch die Ko-Lokalisation-Experimente bestätigt werden [186].

Funktional ist EBP eine $\Delta 8$ – $\Delta 7$ -Sterol-Isomerase, welche als hoch affines Bindungsprotein für den Ca^{2+} -Antagonisten Emopamil und das fotoaffine Azidopamil identifiziert worden ist [186]. Beide Substanzen gehören zur Gruppe der Phenylalkylamine und werden als antiischämische Medikamente eingesetzt. EBP hat eine hohe Ähnlichkeit zu den sogenannten Sigma-Rezeptoren und könnte daher Mitglied einer Superfamilie von Medikamenten-bindenden Proteinen im ER sein [187].

Strukturell besitzt EBP wahrscheinlich vier Transmembrandomänen mit zwei konservierten Glutamat-Resten, welche eventuell bei dem Transport von amphipatischen Kationen eine Rolle spielen. Eine weitere Besonderheit ist die hohe Anzahl von aromatischen Aminosäuren (>23%) in den Transmembrandomänen. Vermutlich sind diese Aminosäuren in den Medikamententransport mit dem P-Glycoprotein beteiligt. [230]

EBP ist das einzige hier identifizierte Protein, für das ein klinischer Phänotyp bekannt ist. Mutationen im EBP-Gen verursachen die Chondrodysplasia punctata, Typ 2 (CDPX29), welche auch als Conradi-Hünemann Syndrom bekannt ist [180,231,232]. Der Phänotyp von CDPX29 ist gekennzeichnet durch punktförmige Kalzifizierung von Knorpelgewebe, dysproportionierter Minderwuchs mit verkürzten Extremitäten, Verhornungsstörung, grauer Star und Dismorphien (hypoplastische Nasenwurzel) [171,177]. Interessanterweise wird CDPX29 als eine Phänokopie der Warfarin-Embryopathie angesehen, welche durch eine starke Vitamin K-Defizienz während der Schwangerschaft, z.B. als Folge überhöhter Warfarin-Dosen ausgelöst werden kann [176,182].

In Folge der Hemmung der VKOR durch Warfarin oder seine Analoge kommt es zu einer Untercarboxylierung der Vitamin K-abhängigen Proteine (VKD) und damit zu einer Störung der Blutgerinnung [177,178,233]. Besonders betroffen sind die Knorpel enthaltenden Organe, so z.B. der Nasenknorpel. Eventuell sind in der Embryonalentwicklung die VKDs Matrix-Gla-Protein

und Osteocalcin empfindlicher gegenüber Untercarboxylierung als die VKD-Gerinnungsfaktoren. Die Versorgung des Embryos mit Blutfaktoren wird ja durch den mütterlichen Kreislauf gewährleistet [234].

Die Interaktion EBP-VKORC1 und die Ähnlichkeiten zwischen Mutationen in EBP und Hemmung des VKOR durch Warfarin lassen einen direkten Zusammenhang zwischen CDPX29 und dem Vitamin K-Zyklus vermuten. Dabei ist die Bedeutung der Isomerase-Aktivität von EBP derzeit unklar, da chemisch weder Warfarin noch Vitamin K als Substrat von EBP in Frage kommen. Daher vermuten wir, dass EBP eventuell eine regulierende Wirkung auf die VKORC1 ausübt.

So würde bei einem aktivierenden Effekt von EBP auch der Phänotyp der Chondrodysplasia punctata zu erklären sein, da Mutationen im EBP eventuell die VKORC1-Aktivierung stören könnten, was wiederum auf die VKORC1 den gleichen Effekt wie die Zugabe von Warfarin hätte. Abbildung 52 gibt dazu eine Modellvorstellung.

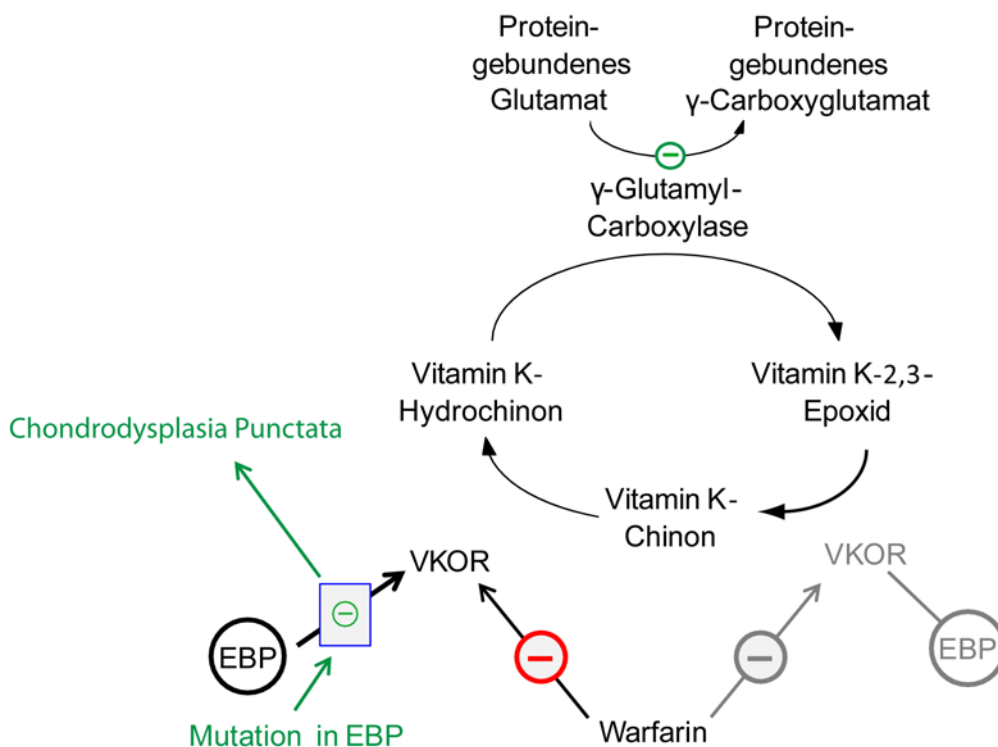


Abbildung 50: **EBP-VKOR-Interaktionsmodell**

Durch Mutationen im EBP-Gen könnte eine Aktivierung des VKORC1 durch EBP gestört werden. Dies würde eine gestörte Kalzifizierung und dadurch die Symptome der Chondrodysplasia punctata erklären, da eine Hemmung der VKORC1 zu einem Mangel an Vitamin K-Hydrochinon und dadurch zu einer verminderten Carboxylierung führt. Einen ähnlichen Phänotyp sieht man bei der Warfarin-Embryopathie, die durch eine Hemmung der VKORC1 durch Warfarin während der Schwangerschaft verursacht wird.

Ob und wenn inwieweit die Regulierung der VKOR-Reaktion mit dem Kalzium-Metabolismus in Zusammenhang steht, bleibt derzeit offen. Da VKD-Proteine wie das Osteocalcin im aktiven, carboxyliertem Zustand Kalziumionen mit höherer Affinität binden und für die γ -Carboxylierung Vitamin K-Hydrochinon als essentieller Kofaktor notwendig ist [11], könnte über diese Interaktion der Vitamin K-Zyklus in Abhängigkeit der verfügbaren Menge als Kalziumionen reguliert werden.

So wäre eine gestörte Aktivierung der VKORC1 über EBP, neben Beeinträchtigung der VKORC1-Aktivität durch Mutationen im VKORC1-Gen bzw. durch Warfarin oder Mutationen im γ -Carboxylase-Gen eine weitere Ursache für nicht ausreichend carboxylierte Osteocalcin- und Matrix-Gla-Proteine, was Symptome wie die Kalzifizierung von Knorpelgewebe und Verhornungsstörungen der CDPX29 erklären würde [96][97][155]. Da beide VKD-Proteine den Kalzium-Stoffwechsel regulieren [98][99], wäre deren Aktivierung über EBP im Wege einer negativen Rückkopplung denkbar.

Da Warfarin nur während der Schwangerschaft dieses Krankheitsbild verursacht, könnte man auch vermuten, dass die EBP-VKORC1-Interaktion physiologisch nicht permanent ist, sondern eventuell nur temporär während der Embryogenese eine Rolle spielt.

4.2.1.5 PDIA6 – VKORC1

Die einzige bekannte Interaktion von VKORC1 wurde mit einer Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) beschrieben [75]. Da in dieser Arbeit allerdings nicht erwähnt wird, welche der Isoformen der PDI-Familie untersucht wurde und die PDIA6 als einziges Thioredoxin (Trx)-like Protein im Split-Ubiquitin-System gefunden wurde, war die PDIA6 ein weiterer Interaktionskandidat, welcher mittels Einzelklonanalyse und Ko-Immunpräzipitation untersucht wurde.

Der Einzelklon-Ansatz lieferte keine Bestätigung für die Interaktion von VKORC1 und der PDI Form A6. Die erneut in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm NMY32 exprimierten Klone wurden auf Transformations-Selektionsmedium (SD-WL) und auf Selektionsmedium, welches die Reporterogenaktivität bestimmt (SD-HWL, SD-AHWL), ausplattiert. Nachdem auf dem SD-trp-leu Medium keine Klone wuchsen, muss man von einem Fehlversuch ausgehen (siehe Abbildung 15). Ob der Hefe ein Plasmid fehlte (VKORC1 und/oder PDIA6) oder ob die beiden Proteine in Kombination toxisch für die Hefe sind, kann man nicht entscheiden.

Die Interaktion von VKORC1 mit PDIA6 wurde zusätzlich mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht, wobei aber auch keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden konnte.

Wegen ihrer Funktion sind die PDIs aber weiterhin interessante Kandidaten. Die Protein-Disulfid-Isomerasen (Enzyme Classification E.C. 5.3.4.1) sind Proteine im Lumen bzw. der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, deren Funktion die Oxidation, Reduktion und die damit verbundene Umlagerung von Disulfid-Brücken bei einer ganzen Reihe von Proteinen ist. [75,228,229,235-237]

Zu der PDI-Familie wurden mittlerweile 19 Mitglieder publiziert (siehe Tabelle 13) [236,237]. Es bleibt daher zu klären, welche der PDI-Formen die VKORC1 reduziert.

Name	Accession	Länge	ER-Motif	Domain Komposition	Anzahl von a-Typ Domänen	Sequenz der Aktiven-Seite
Hag3	Q8TD06	163	QSEL ^b	a	1	CQYS
ERp18	O95881	172	EDEL	a	1	CGHC
Hag2	O95994	175	KTEL ^b	a	1	CPHS
ERp28	P30040	261	KEEL	b-D	0	k.A.
ERp27	Q96DN0	273	KVEL	b-b'	0	k.A.
ERp44	Q9BS26	406	RDEL	a-b-b'	1	CRFS
ERp46 (EndoPDI)	Q8NBS9	432	KDEL	a°-a-a'	3	CGHC; CGHCM CGHC
P5 (PDIA6)	Q15084	440	KDEL	a°-a-b	2	CGHC; CGHC
ERp57	P30101	505	QEDL	a-b-b'-a'	2	CGHC; CGHC
PDI	P97237	508	KDEL	a-b-b'-a'	2	CGHC; CGHC
PDIr	Q14554	519	KEEL	b-a°-a-a'	3	CSMC; CGHC; CPHC
PDIp	Q13087	525	KEEL	a-b-b'-a'	2	CGHC; CTHC
PDIILT	Q8N807	584	KEEL	a-b-b'-a'	2	SKQS; SKKC
ERp72	P13677	645	KEEL	a°-a-b-b'-a'	3	CHGC; CGHC; CGHC
ERdj5	Q81IXB1	793	KDEL	J-a''-b-a°-a-a'	4	CSHC; CPPC; CHPC; CGPC
TMX	Q9H3N1	280	Unbekannt	a	1	CPAC
TMX2	Q9Y320	286	KKDK	a	1	SNDC
TMX4	Q9H1E5	349	RQR	a	1	CPSC
TMX3	FLJ20793	454	KKKD	a-b-b'	1	CGHC

Tabelle 13: **Überblick der PDI-Familie (Homo sapiens).**

Die PDI-Formen sind nach ihrer Größe aufgelistet. Oberhalb der dicken Linie sind die löslichen Proteine, darunter die Transmembran-Proteine genannt. Die kursiv und fett markierten Domänen sind die Thioredoxin-like Domänen, deren Struktur bekannt ist. Die untersuchte Form P5 (= PDIA6) ist rot markiert [236].

Die PDIA6, welche auch als Endoplasmisches Reticulum Protein 5 (ERp5), TXNDC7 oder P5 bezeichnet wird, zählt zu den löslichen Proteinen [210]. Die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführte indirekte Ko-Lokalisation konnte mit der Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie eine räumliche Nähe von PDIA6 und VKORC1 nahelegen (siehe Abbildung 40).

Bekannt ist, dass PDIA6 nicht-kovalent an BiP (Binding immunoglobulin protein, auch bekannt als 78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) oder heat shock 70 kDa protein 5 (HSPA5)) bindet [77]. BiP ist ein Chaperon, welches im Lumen des ER an neu synthetisierte Proteine bindet und ihre Translokation in das ER, sowie ihre Faltung und Oligomerisierung katalysiert. [235,238,239]

Die nach Abschluss meiner experimentellen Arbeiten veröffentlichte Publikation von Schulman et al. zeigt ebenfalls mittels Ko-Immunpräzipitation, dass die PDI-Form A6 nicht die Funktion als Elektronen-Donor für VKORC1 ausübt [74]. Hinzu kommt, dass die PDIA6 zu den häufigen unspezifischen Treffern in DUALmembran System gehört (K. Rutschmann, Dualsystems Biotech, persönliche Mitteilung), was ebenfalls dafür spricht, dass es sich hierbei um einen falsch-positiven Treffer handelt. Schulman et al. identifizierten die PDI-Form A16 und die TMX als die Interaktionspartner der VKORC1 [74].

4.2.1.6 FGG – VKORC1

Das Fibrinogen Gamma Polypeptid (FGG) ist, wie der Name schon sagt, die Gamma-Komponente des Fibrinogens [240].

Das Glykoprotein Fibrinogen (Faktor I) setzt sich aus drei Untereinheiten (α , β , γ) zusammen, welches im Zuge der Blutgerinnung von Thrombin und Kalzium in Fibrin gespalten wird. Fibrin ist für die Bildung von Thromben verantwortlich und ein Kofaktor der Thrombozytenaggregation. Die Gamma-Untereinheit bindet hierbei an einen spezifischen Rezeptor der Blutplättchen [241].

Da FGG der einzige Treffer im Split-Ubiquitin-System war, der direkt mit der Blutgerinnung in Zusammenhang steht, wurde versucht, die Interaktion von FGG und VKORC1 mittels Ko-Immunpräzipitation überprüft, konnte allerdings nicht bestätigt werden.

4.2.1.7 CD63 – VKORC₁

Das menschliche CD63-Molekül (CD63 oder Lamp-3) war mit 19 Treffern im Split-Ubiquitin System das am häufigsten identifizierte Protein. Daher wurde CD63 auch im Einzell-Interaktionsnachweis getestet, was die Interaktion bestätigte. Es gelang allerdings nicht, die Interaktion auch in der Ko-Immunpräzipitation nachzuweisen. Ob dies an den Versuchsbedingungen lag, oder ob wirklich keine Interaktion besteht, kann nicht derzeit beantwortet werden.

CD63, welches auch als Melanoma-Associated Antigen Mla1 und ME491 oder Granulophysin bezeichnet wird, gehört zu der Transmembran-4-Superfamilie, auch als Tetraspanin-Familie bekannt. Die meisten dieser Proteine sind Zelloberflächen-Glykoproteine mit vier hydrophoben und einer großen extrazellulären Domäne. Das N- und C-terminale Ende reicht in den intrazellulären Raum. Durch alternatives Splicen entstehen allerdings mehrere Transkriptionsvarianten, welche unterschiedliche Proteine kodieren. [242,243]

Die Proteine der Tetraspanin-Familie assoziieren in der Plasmamembran mit weiteren Proteinen wodurch ein sogenanntes Tetraspanin-Netzwerk gebildet wird. Ein Tetraspanin-Netz („tetraspanin web“), auch als Tetraspanin-angereicherte Mikrodomäne bezeichnet („tetraspanin enriched microdomain“), ist ein übergeordnete Komplex mit dynamischem Gleichgewicht aus primären, sekundären und tertiären Interaktionen und setzt sich, abhängig von Zelltyp und –zustand, aus unterschiedlichen Tetraspaninen mit verschiedenen assoziierten Proteinen zusammen. Dieses trägt so zu den zelltypspezifischen Funktionen und deren Regulation bei. [244]

Bei der primären oder auch direkten Interaktion werden spezifische und stabile Assoziationen eines Tetraspanins mit dem Partnermolekül vorausgesetzt. Dies kann die Bildung von Homodimeren, -trimeren, oder -tetrameren bedeuten, aber auch die Bindung an weitere Transmembranproteine. So ist mittlerweile bekannt, dass CD63 einen Komplex mit Integrinen und EWI-Proteinen bildet. Die Interaktion von CD63 mit den CD-Proteinen 117 [245] und 82 [246] wurde ebenfalls bereits publiziert.

Die Interaktion an Integrine, EWI-Proteine oder CD19 kann bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen, wobei diese Komplexe so stabil sind, dass sie selbst nach

Solubilisierung mit stringenten Detergenzien (z. B. Digitonin oder Triton X-100) erhalten bleiben. [242,247]

Exprimiert wird CD63 vor allem in Blutplättchen, neutrophilen Granulozyten und im Endothel [243].

Lokalisiert wurde CD63 in endozytotischen Membranen wie den primären Lysosomen [248]. Im Zuge der Koloalisations-Studien mit VKORC1 konnte mit Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie eine räumliche Nähe von CD63 und VKORC1 festgestellt werden, wobei lysosomale Enzyme im ER synthetisiert werden und daher eine räumliche Nähe bzw. eine Überlagerung in der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie zustande kommen kann.

Durch ihre physiologische Funktion als vielseitige „molekulare Netzwerker“ sind die Mitglieder der Tetraspanin-Familie prädestiniert zur Interaktion mit anderen (Membran-)Proteinen. Es bedarf, trotz unbestätigter Interaktion in der Ko-Immunpräzipitation, weiterer Untersuchungen um abzuklären, ob die initial positive Interaktion von CD63 und VKORC1 doch eine reale Grundlage hat.

4.2.2 Überschneidungen der Ergebnisse für VKORC₁ und VKORC_{1L1}

Bei der Analyse der VKORC1- und VKORC1L1-Interaktionskandidaten gab es einige Überschneidungen. Darunter fallen auch die 3 häufigsten Treffer CD63, EBP und SERP1.

Interessant war auch, dass VKORC1 nicht die VKORC1L1 als Treffer hatte, jedoch konnte anders herum eine Interaktion im Split-Ubiquitin-Screen gefunden werden.

Der durchgeführte Köder-Abhängigkeits-Test konnte bei VKORC1 alle Interaktionskandidaten bis auf die PDIA6 bestätigen. Bei dem Köder-Abhängigkeits-Test mit VKORC1L1 konnten alle 4 getesteten Interaktionskandidaten bestätigt werden, auch die PDIA6, welche jedoch im ersten Screen mit VKORC1L1 als Köder nicht gefunden worden war (siehe Tabelle 14).

Köder: VKORC1 VKORC1L1**Beute:**

CD63 molecule (CD63)	<i>19</i>	<i>17</i>
emopamil binding protein (sterol isomerase) (EBP)	<i>17</i>	<i>9</i>
stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)	<i>16</i>	<i>12</i>
vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1)	<i>8</i>	7
protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6)	<i>4</i>	<i>0</i>
fibrinogen gamma chain (FGG), transcript variant gamma-A	<i>1</i>	0

Tabelle 14: **Überschneidungen der Ergebnisse von VKORC1 und VKORC1L1.**

Die kursiv markierten Treffer wurden in einem Köder-Anhängigkeits-Test untersucht. Die grün markierten Treffer waren in diesem Test positiv, wobei die PDIA6 bei VKORC1 im Test nicht funktioniert hatte.

Diese Überlappung bei den Treffern kann sich zum einen aus der hohen Sequenz- und Strukturhomologie der beiden VKOR-Proteine erklären. Zum anderen kann es auch ein Hinweis darauf sein, dass auch das Split-Ubiquitin-System – wie jedes derartige Screeningsystem – eine gewisse *a priori*-Wahrscheinlichkeit besitzt, falsch-positive Kandidaten zu finden. Dies macht die Notwendigkeit eines weiteren, unabhängigen Interaktionsnachweises wie der Ko-Immunpräzipitation deutlich.

4.2.3 VKORC1L1-Interaktionspartner

Betrachtet man nur die starke Sequenz- und Struktur-Homologie sowie die kinetischen Eigenschaften von VKORC1L1, so könnte man vermuten, dass VKORC1L1 ebenfalls ein Mitglied des VKOR-Komplexes ist. Dagegen sprechen die Beobachtungen, dass VKORC1L1 einen Funktionsverlust von VKORC1 *in vivo* nicht kompensieren kann (vgl. Kapitel 4.1).

Erst in allerjüngster Zeit sind konkrete Daten zur Funktion von VKORC1L1 vorgelegt worden [221]. Danach wäre VKORC1L1 an Redox-Prozessen zum Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Spezies beteiligt. Unter anderem variieren die Expressionsprofile von VKORC1L1 und VKORC1 unter Stress stark (siehe Abbildung 48). In Interaktionsstudien wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wäre also zu erwarten gewesen, dass die beiden Proteine ggf. auch verschiedene Partnerproteine identifizieren sollten. Tatsächlich haben jedoch die beiden Proteine häufig die gleichen Klone aus der c-DNA-Klonbank gefischt. Das kann man eventuell anhand der hohen Homologie erklären. Für Hinweise auf die physiologische Funktion der VKORC1L1 war der Interaktionsscreen jedoch leider unergiebig.

4.2.4 γ -Glutamyl-Carboxylase- Interaktionspartner

Die γ -Glutamyl-Carboxylase (GGCX) nimmt in der Carboxylierung eine zentrale Stellung ein und ist auf direkte Interaktionen mit dem VKOR-Komplex zur Übernahme der Reduktionäquivalente angewiesen [91]. Abbildung 51 zeigt ein Modell zu den Beziehungen zwischen GGCX, VKORC1 und den verschiedenen VKD-Proteinen, die eine Carboxylierung benötigen.

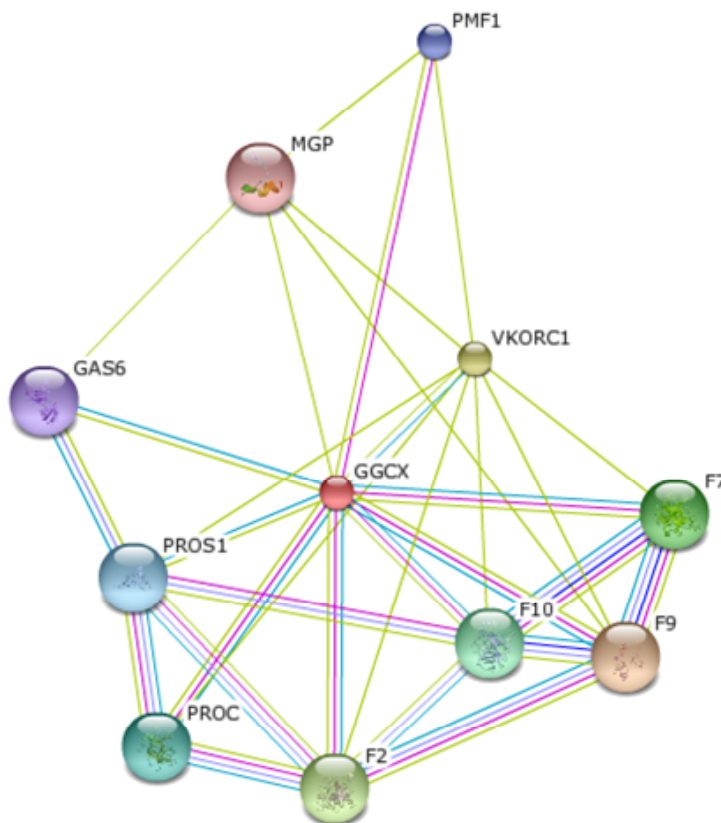


Abbildung 51: **GGCX Interaktionsvorhersage mittels STRING Version 8.3, Juni 2010.**

Die Farbigen Linien repräsentieren die verschiedenen Beweistypen der Interaktion. Die grüne Linie verweist auf zelluläre Nachbarschaft, die dunkelblaue Linie auf das gemeinsame Vorkommen in einem Kompartiment, die lila Linie auf experimentelle Hinweise, die türkisene Linie auf Datenbankrecherchen und die gelbe Linie auf Literaturverweise (<http://string-db.org>).

Infolge dieser zentralen Stellung, wäre die γ -Carboxylase ein idealer Köder im Split-Ubiquitin-System, um neue Interaktionspartner zu finden. Die GGCX-cDNA wurde in zwei unterschiedliche „Köder“-Vektoren kloniert, allerdings waren beide „Köder“-Konstrukte im System nicht funktional (siehe Abschnitt 3.2.1). Aus Zeitgründen wurde dieser Projektteil nicht weiter verfolgt.

Da allerdings im VKOR-Interaktionsscreen, sowohl mit VKORC1 als auch mit VKORC1L1 als Köder, die γ -Carboxylase nicht gefunden wurde, gibt es keine neuen Anhaltspunkte dafür, dass die GGCX tatsächlich direkt mit der VKOR interagiert.

4.3 Ausblick

Wie bei allen derartigen Screeningverfahren, ist der Ausgang nicht vorhersagbar. Aus der großen Anzahl primärer Treffer wurde in Rahmen dieser Arbeit eine kleine Gruppe von Proteinen nach Häufigkeit und Plausibilität der möglichen Interaktion herausgegriffen, um durch Ko-Immunpräzipitationsexperimente die initiale Interaktion in Hefe zu verifizieren. Dies ist bei fast allen Proteinen gelungen.

Für hoch interessant halten wir die Interaktion von VKORC1 mit EBP und dem dadurch entstandenen neuen Ansatz zum Verständnis der X-dominant vererbten Chondrodysplasia punctata. Funktionelle Assays müssen im Weiteren den Mechanismus der Interaktion untersuchen, um das Krankheitsbild sowie die Funktion von VKORC1 besser zu verstehen.

Die Interaktion von VKORC1 und SERP1 wird auch in Hinblick auf die neuesten Daten zur Rolle der VKORC1L1 in der Protektion vor oxidativen, zellulärem Stress interessant. Hierbei müsste allerdings die Interaktion von VKORC1 und SERP1 biochemisch und funktionell weiter untersucht werden. Unabhängig davon könnte die primäre Trefferliste noch einmal auf entsprechend Proteine überprüft werden.

Um diese Interaktionen weiter zu erhärten und besser zu verstehen, ist eine Reihe von Folgeexperimenten denkbar:

- Die Frage nach dem stöchiometrischen Aufbau des VKORC1-Komplexes könnte mittels nativer Gele nach Ko-Immunpräzipitation weiter untersucht werden. Durch Analysen mittels Massenspektrometer könnte die Komplexgröße bestimmt werden, wobei zur Stabilisierung des Komplexes zusätzlich Cross-Linker verwendet werden könnten.
- Eine weitere Methode Proteininteraktionen *in vitro* nachzuweisen, ist der Pulldown-Assay. Dieser Assay ähnelt der Immunpräzipitation, mit dem Unterschied, dass der Affinitäts-Tag die Antikörper Funktion übernimmt.

- Die Struktur von Membranproteinen zu klären, ist eine anspruchsvolle Aufgabe. Mittels Kristallisation, welche allerdings eine effektive Solubilisierung des nativen Komplexes voraussetzt, könnte die Frage nach dem Aufbau des VKORC1-Komplexes beantwortet werden, hierzu müsste allerdings VKORC1 mit den fraglichen Kandidaten koexprimiert werden und dieser Komplex im ganzen solubilisiert und kristallisiert werden.
- Eine weitere Möglichkeit bieten neue Methoden wie z.B. die von Oling Bioscience entwickelten Duolink Lumminoassay Reagenzien, welche es ermöglichen Proteininteraktionen zu visualisieren und zu quantifizieren [249].

Erst kürzlich stellte Banning et al. eine weitere Methode vor um Protein-Interaktionen in lebenden Säugetierzellen schnell, quantitativ und hoch reproduzierbar zu erkennen [250]. Die entwickelte Methode basiert auf einer FRET-Analyse (Försters-Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Analyse), bei der einzelne Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden. Banning kombinierte die FRET-Analyse mit einer Methode, die es möglich macht tausende lebender Zellen innerhalb von Minuten zu analysieren. Hierfür wird kein Fluoreszenz-Mikroskop verwendet, sondern ein FACS-Gerät (Durchflusszytometer).

Die FACS/FRET-Methode soll es ermöglichen verlässliche, gut reproduzierbare statistische Aussagen über die Interaktion zweier Proteine in verschiedenen Kompartimenten lebender Zellen zu treffen.

Unabhängig von den bestätigten Interaktionen könnten die primären Trefferlisten von VKORC1 und VKORC1L1 noch einmal auf weitere interessante Kandidatenproteine überprüft werden.

5. ANHANG

5.1 Literaturverzeichnis

- [1] H. Dam, "Cholesterinstoffwechsel in Hünereiern und Hühnchen," *Biochem. Zeitschrift*, vol. 215, 1929, pp. 475-92.
- [2] M. Stahmann, C. Huebner, and K. Link, "Studies on the Hemorrhagic Sweet clover disease V. Identification and Tynthesis of the hemorrhagic Agent*," *J Biol Chem*, vol. 65, 1940, pp. 513-27.
- [3] H. Dam, "The discovery of vitamin K, its biological functions and therapeutical application," *Nobel Lecture*, 1946.
- [4] M. Tishler, L. Fieser, and N. Wendler, "Hydro, Oxido and Other Derivatives of Vitamin K, and Related Compounds," *J Am Chem Soc*, vol. 62, 1940, pp. 2866-71.
- [5] S. Magnusson, "The Chemistry of the Activation of Prothrombin," *Biochem J*, vol. 115, 1969, p. 2P-3P.
- [6] L. Chen and J.M. Buchanan, "Mitogenic Activity of Blood Components. I. Thrombin and Prothrombin," *Proc Nat Acad Sci USA*, vol. 72, 1975, pp. 131-5.
- [7] A. Girolami, R. Scandellari, M. Scapin, and S. Vettore, "Congenital bleeding disorders of the vitamin K-dependent clotting factors," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 281-374.
- [8] K. Berkner, "Vitamin K-dependent carboxylation," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 131-56.
- [9] G. Nelsestuen, T. Zytovicz, and J. Howard, "The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin," *J Biol Chem*, vol. 249, 1974, pp. 6347-50.

-
- [10] J. Stenflo, P.E.R. Fernlund, W. Egant, and P. Roepstorfft, "Dependent Modifications of Glutamic Acid Residues in Prothrombin," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 71, 1974, pp. 2730-3.
- [11] B. Furie, B.A. Bouchard, and B.C. Furie, "Vitamin K-Dependent Biosynthesis of gamma-Carboxyglutamic Acid," *Blood*, vol. 93, 1999, pp. 1798-808.
- [12] P. Newman and M. Shearer, "Vitamin K metabolism," *Subcell Biochem*, vol. 39, 1998, pp. 455-88.
- [13] M. Shearer, A. McBurney, and P. Barkhan, "Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man," *Vitam Horm*, vol. 32, 1974, pp. 513-42.
- [14] J. Suttie, "Vitamin K-dependent carboxylation of glutamyl residues in proteins," *Biofactors*, vol. 1, 1988, pp. 55-60.
- [15] S. Rost, A. Fregin, V. Ivaskevicius, H.-joachim Pelz, E. Conzelmann, K. Ho, K. Lappégard, E. Seifried, I. Scharrer, E.G.D. Tuddenham, C.R. Müller, T.M. Strom, and J. Oldenburg, "Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2," *Nature*, vol. 427, 2004, pp. 537-41.
- [16] T. Li, C.-Y. Chang, D.-Y. Jin, P.-J. Lin, A. Khvorova, and D.W. Stafford, "Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase," *Nature*, vol. 427, 2004, pp. 541-4.
- [17] D. Cain, S.M. Hutson, and R. Wallin, "Assembly of the Warfarin-sensitive Vitamin K 2,3-Epoxyde Reductase Enzyme Complex in the Endoplasmic Reticulum Membrane*," *J Biol Chem*, vol. 272, 1997, pp. 29068-75.
- [18] D. Cain, S.M. Hutson, and R. Wallin, "Warfarin Resistance Is Associated with a Protein Component of the Vitamin K 2,3-Epoxyde Reductase Enzyme Complex in Rat Liver," *Thromb Haemost*, vol. 80, 1998, pp. 128-33.
- [19] J. Staubesand, *Benninghoff Anatomie*, Urban & Springer, 1994.
- [20] Pötzsch, *Hämostaseologie*, Springer, 2010.

-
- [21] J. Launay, P.H. Ervé, K.P.E.O.C. H, C.T. Ournois, J.C. Allebert, and C.G.N. Ebigil, "Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension," *Nat Med*, vol. 8, 2002, pp. 1129-35.
- [22] J.P. Riddel, B.E. Aouizerat, C. Miaskowski, and D.P. Lillicrap, "Theories of Blood Coagulation," *J Pediatr Oncol Nurs*, vol. 24, 2007, pp. 123-31.
- [23] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [24] M. Silverberg, J. Dunn, L. Garen, and A. Kaplan, "Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate," *J Biol Chem*, vol. 255, 1980, pp. 7281-6.
- [25] S. Reddigari, Y. Shibayama, T. Brunnée, and A. Kaplan, "Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells," *J Biol Chem*, vol. 268, 1993, pp. 11982-7.
- [26] F. España and O. Ratnoff, "Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases," *J Lab Clin Med*, vol. 102, 1983, pp. 31-45.
- [27] F. Citarella, W. Wuillemin, Y. Lubbers, and C. Hack, "Initiation of contact system activation in plasma is dependent on factor XII autoactivation and not on enhanced susceptibility of factor XII for kallikrein cleavage," *Br J Haematol.*, vol. 99, 1997, pp. 197-205.
- [28] K. Fujikawa, M. Legaz, H. Kato, and E. Davie, "The mechanism of activation of bovine factor IX (Christmas factor) by bovine factor XIa (activated plasma thromboplastin antecedent)," *Biochemistry*, vol. 13, 1974, pp. 4508-16.
- [29] H. Penzlin, *Lehrbuch der Tierphysiologie*, Gustav Fischer Verlag, 1996.
- [30] T. Nakagaki, D. Foster, K. Berkner, and W. Kisiel, "Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII," *Biochemistry*, vol. 30, 1991, pp. 10819-24.

-
- [31] K. Mann and L. L., "Proteolytic enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation. Part A. Mammalian blood coagulation factors and inhibitors," *Methods Enzymol*, vol. 222, 1993, pp. 1-559.
- [32] C.T. Esmon, "Regulation of blood coagulation," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1477, 2000, pp. 349-60.
- [33] G.G. Sofi F, Cesari F, Fedi S, Abbate R, "Protein Z: "light and shade" of a new thrombotic factor," *Clin Lab*, vol. 50, 2004, pp. 647-52.
- [34] M. Bajaj, M. Kuppuswamy, A. Manepalli, and S. Bajaj, "Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues," *Thromb Haemost*, vol. 82, 1999, pp. 1047-52.
- [35] D. Bowen, "Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights," *Mol Pathol*, vol. 55, 2002, pp. 127-44.
- [36] P.H.B. Bolton-Maggs and K.J. Pasi, "Haemophilias A and B," *Lancet*, vol. 361, 2003, pp. 1801-9.
- [37] ÖHG und Wyeth-Lederle Pharma GmbH, eds., *Hämophilie - Die Antwort: Ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern*, Eschig Verlag, 2004.
- [38] J. Graw, H.-H. Brackmann, and J. Oldenburg, "Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies," *Nat Rev Genet*, vol. 6, 2005, pp. 488-501.
- [39] J. Oldenburg and R. Schwaab, "Molecular Biology of Blood Coagulation," *Semin Thromb Hemost*, vol. 27, 2001, pp. 313-24.
- [40] J. Robertson, D. Lillicrap, and P. James, "Von Willebrand disease," *Pediatr Clin North Am*, vol. 55, 2008, pp. 377-92.
- [41] A. Thompson, J. Gill, B. Ewenstein, G. Mueller-Velten, and B. Schwartz, "Successful treatment for patients with von Willebrand disease undergoing urgent surgery using factor VIII / VWF," *Haemophilia*, vol. 10, 2004, pp. 42-51.

-
- [42] H. Renz-Polster and S. Krautzig, *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban & Fischer Verlag, 2008.
- [43] J. Oldenburg, M. Marinova, C. Müller-Reible, and M. Watzka, "The vitamin K cycle," *Vitam Horm.*, vol. 78, 2008, pp. 35-62.
- [44] G. Merli and J. Fink, "Vitamin K and thrombosis," *Vitam Horm.*, vol. 78, 2008, pp. 265-79.
- [45] O. Benzakour, "Vitamin K-dependent proteins: Functions in blood coagulation and beyond," *Thromb Haemost.*, vol. 100, 2008, pp. 527-9.
- [46] E.C.M. Cranenburg, L.J. Schurgers, and C. Vermeer, "Vitamin K: The coagulation vitamin that became omnipotent," *Thromb Haemost.*, vol. 98, 2007, pp. 120-5.
- [47] K. Berkner and K. Runge, "The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis," *J Thromb Haemost.*, vol. 2, 2004, pp. 2118-32.
- [48] J. Gross, W.K. Cho, L. Lezhneva, J. Falk, K. Krupinska, K. Shinozaki, M. Seki, and R.G. Herrmann, "A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes," *J Biol Chem*, vol. 281, 2006, pp. 17189-96.
- [49] A. Ortiz, J. Villalain, and J.C. Gomcez-Fernandez, "The interaction of vitamin K with phospholipid vesicles," *Biochim Biophys Acta*, vol. 863, 1986, pp. 185-92.
- [50] M. Linnemann and M. Kühl, *Biochemie für Mediziner*, Springer Verlag, 2004.
- [51] S.M. Plaza and D.W. Lamson, "Vitamin K2 in Bone Metabolism and Osteoporosis," *Altern Med Rev*, vol. 10, 2005, pp. 24-35.
- [52] H.H.W. Thijssen, L.M.T. Vervoort, L.J. Schurgers, and M.J. Shearer, "Menadione is a metabolite of oral vitamin K," *Br J Nutr*, vol. 95, 2006, pp. 260-6.
- [53] H. Dam, "The antihæmorrhagic vitamin of the chick," *Biochem J.*, vol. 29, 1935, pp. 1273-85.

-
- [54] P. Trumbo, A. Yates, S. Schlicker, and M. Poos, "Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc," *J Am Diet Assoc*, vol. 101, 2001, pp. 294-301.
- [55] S.L. Booth and J.W. Suttie, "Dietary intake and adequacy of vitamin K," *J Nutr*, vol. 128, 1998, pp. 785-8.
- [56] L.J. Schurgers and C. Vermeer, "Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1570, 2002, pp. 27-32.
- [57] S. Booth and A. Al Rajabi, "Determinants of vitamin K status in humans," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 1-22.
- [58] R. Bell and J. Matschiner, "Vitamin K activity of phylloquinone oxide," *Arch Biochem Biophys*, vol. 141, 1970, pp. 473-6.
- [59] H.C. Buitenhuis, B.A.M. Soute, and C. Vermeer, "Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1034, 1990, pp. 170-5.
- [60] B. Dahlbäck, "Blood coagulation," *Lancet*, vol. 355, 2000, pp. 1627-32.
- [61] S.R. Presnell and D.W. Stafford, "The Vitamin K-dependent Carboxylase*," *Thromb Haemost*, vol. 87, 2002, pp. 937-46.
- [62] M.J. Shearer, "Gamma-Glutamyl Carboxylation: Squaring the Vitamin K Cycle," *Blood*, vol. 108, 2006, pp. 1795-96.
- [63] P.-H. Chu, T.-Y. Huang, J. Williams, and D.W. Stafford, "Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 103, 2006, pp. 19308-13.
- [64] P.C. Preusch and D.M. Smalley, "Vitamin K₁ 2, 3- epoxide and quinone reduction: Mechanism and inhibition," *Free Radic Res Commun*, vol. 8, 1990, pp. 401-15.

-
- [65] D.-Y. Jin, J.-K. Tie, and D.W. Stafford, "The Conversion of Vitamin K Epoxide to Vitamin K Quinone and Vitamin K Quinone to Vitamin K Hydroquinone Uses the Same Active Site Cysteines," *Biochemistry*, vol. 46, 2007, pp. 7279-83.
- [66] P. Joseph and A.K. Jaiswal, "NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[alpha]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 91, 1994, pp. 8413-7.
- [67] X. Gong, R. Gutala, and A. Jaiswal, "Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 85-101.
- [68] T.M. Guenther, D. Cai, and R. Wallin, "Co-purification of Microsomal Epoxide Hydrolase with the Warfarin-Sensitive Vitamin K1 Oxide Reductase of the Vitamin K Cycle," *Biochem Pharmacol*, vol. 55, 1998, pp. 169-75.
- [69] N. Wajih, D.C. Sane, S.M. Hutson, and R. Wallin, "The Inhibitory Effect of Calumenin on the Vitamin K-dependent gamma-Carboxylation System," *J Biol Chem*, vol. 279, 2004, pp. 25276-83.
- [70] J. Tie and D. Stafford, "Structure and function of vitamin K epoxide reductase," *Vitam Horm.*, vol. 78, 2008, pp. 103-30.
- [71] M. Miyata, G. Kudo, Y.-hue Lee, T.J. Yang, H.V. Gelboin, P. Fernandez-salguero, S. Kimura, and F.J. Gonzalez, "Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene," *J Biol Chem*, vol. 274, 1999, pp. 23963-8.
- [72] D.W. Stafford, "The vitamin K cycle," *J Thromb Haemost*, vol. 3, 2005, pp. 1873-8.
- [73] G. Spohn, A. Kleinridders, F.T. Wunderlich, M. Watzka, F. Zaucke, K. Blumbach, C. Geisen, E. Seifried, C. Müller, M. Paulsson, J.C. Brüning, and J. Oldenburg, "VKORC1 deficiency in mice causes early postnatal lethality due to severe bleeding," *Thromb Haemost*, vol. 101, May. 2009, pp. 1044-50.

-
- [74] S. Schulman, B. Wang, W. Li, and T.A. Rapoport, "Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 107, Aug. 2010, pp. 15027-32.
- [75] N. Wajih, S.M. Hutson, and R. Wallin, "Disulfide-dependent Protein Folding Is Linked to Operation of the Vitamin K Cycle in the Endoplasmic Reticulum," *J Biol Chem*, vol. 282, 2007, pp. 2626-35.
- [76] C. Turano, S. Coppari, F. Altierie, and A. Ferraro, "Proteins of the PDI Family: Unpredicted Non-ER Locations and Functions," *J Cell Physiol*, vol. 193, 2002, pp. 154-63.
- [77] C.E. Jessop, R.H. Watkins, J.J. Simmons, M. Tasab, and N.J. Bulleid, "Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins," *J Cell Sci*, vol. 122, 2009, pp. 4287-95.
- [78] S. Chakravarthi, C.E. Jessop, and N.J. Bulleid, "The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress," *EMBO Rep*, vol. 7, 2006, pp. 1-5.
- [79] H.-J. Pelz, S. Rost, M. Hünenberg, A. Fregin, A.-C. Heiberg, K. Baert, A.D. MacNicoll, C.V. Prescott, A.-S. Walker, J. Oldenburg, and C.R. Müller, "The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents," *Genetics*, vol. 170, 2005, pp. 1839-47.
- [80] W. Li, S. Schulman, R.J. Dutton, D. Boyd, J. Beckwith, and T.A. Rapoport, "Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase," *Nature*, vol. 463, 2010, pp. 507-12.
- [81] S. Rost, A. Fregin, D. Koch, M. Compes, C. Müller, and J. Oldenburg, "Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors," *Br J Haematol*, vol. 126, 2004, pp. 546-9.
- [82] R. Schwarz, P.N. Seibel, S. Rahmann, C. Schoen, M. Huenerberg, C. Mu, T. Dandekar, R. Karchin, and T. Mu, "Detecting species-site dependencies in large multiple sequence alignments," *Nucleic Acids Res*, vol. 37, 2009, pp. 5959-68.

-
- [83] M. Hünérberg, "Erstcharakterisierung des Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1 Proteins," 2009.
- [84] OMIM_137167, "GAMMA-GLUTAMYL CARBOXYLASE; GGCX."
- [85] W. Kuo, D. Stafford, J. Cruces, J. Gray, and J. Solera, "Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12," *Genomics*, vol. 25, 1995, pp. 746-8.
- [86] T. Carlisle and J. Suttie, "Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver," *Biochemistry*, vol. 19, 1980, pp. 1161-7.
- [87] C. Stanton, R. Taylor, and R. Wallin, "Processing of prothrombin in the secretory pathway," *Biochem J*, vol. 277, 1991, pp. 59-65.
- [88] S.-M. Wu, W.-F. Cheung, D. Frazier, and D.W. Stafford, "Cloning and Expression of the cDNA for Human γ -Glutamyl Carboxylase," *Science*, vol. 254, 1991, pp. 1634-6.
- [89] I. Schmidt-Krey, W. Haase, V. Mutucumarana, D.W. Stafford, and W. Kühlbrandt, "Two-dimensional crystallization of human vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase," *J Struct Biol*, vol. 157, 2007, pp. 437-42.
- [90] B. Furie and B.C. Furie, "The molecular basis of blood coagulation," *Cell*, vol. 53, May. 1988, pp. 505-18.
- [91] K.L. Berkner, "The Vitamin K-Dependent Carboxylase," *Annu Rev Nutr*, vol. 25, 2005, p. 127-49.
- [92] J. Stenflo and J. Suttie, "Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid," *Annu Rev Biochem*, vol. 46, 1977, pp. 157-72.
- [93] M.J. Jorgensen, A.B. Cantor, B.C. Furie, C.L. Brown, C.B. Shoemaker, and B. Furie, "Recognition Site Directing Vitamin K-Dependent gamma- Carboxylation Resides on the Propeptide of Factor IX," *Cell*, vol. 48, 1997, pp. 185-91.
- [94] L. Bellido-Martín and P. De Frutos, "Vitamin K-dependent actions of Gas6," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 185-209.

-
- [95] S. Goruppi, E. Ruaro, and C. Schneider, "Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts," *Oncogene*, vol. 12, 1996, pp. 471-80.
- [96] J. Danziger, "Vitamin K-dependent Proteins, Warfarin, and Vascular Calcification," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 3, 2008, pp. 1504-10.
- [97] R.J. Levy, J.A. Zenker, J.B. Lian, and D. Cardiology, "Vitamin K-dependent Calcium Binding Proteins in Aortic Valve Calcification," *J Clin Invest*, vol. 65, 1980, pp. 563-6.
- [98] J.D. Fraser and P.A. Price, "Lung, Heart, and Kidney Express High Levels of mRNA for the Vitamin K-dependent Matrix Gla Protein," *J Biol Chem*, vol. 263, 1988, pp. 11033-6.
- [99] T.B. Stanley, D.-yun Jin, P.-jen Lin, D.W. Stafford, C. Hill, and N. Carolina, "The Propeptides of the Vitamin K-dependent Proteins Possess Different Affinities for the Vitamin K-dependent Carboxylase," *J Biol Chem*, vol. 274, 1999, pp. 16940-4.
- [100] G. Luo, P. Ducy, M.D. McKnee, G.J. Pinero, E. Loyer, R.R. Behringer, and G. Karsenty, "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein," *Nature*, vol. 386, 1997, pp. 78-81.
- [101] OMIM_112260, "GAMMA-CARBOXYGLUTAMIC ACID PROTEIN, BONE; BGLAP."
- [102] P. Hauschka, J. Lian, D. Cole, and C. Gundberg, "Osteocalcin and Matrix Gla Protein: Vitamin K-Dependent Proteins in Bone," *Physiol Rev*, vol. 69, 1989, pp. 990-1047.
- [103] D.P. Morris, B.A.M. Soute, C. Vermeer, and D.W. Stafford, "Characterization of the Purified Vitamin K-dependent gamma-Glutamyl Carboxylase *," *Biochemistry*, vol. 268, 1993, pp. 8735-42.
- [104] S.P. Saxena, E.D. Israels, and L.G. Israels, "Novel vitamin K-dependent pathways regulating cell survival," *Apoptosis*, vol. 6, 2001, pp. 57-68.
- [105] J. Kulman, J. Harris, B. Haldeman, and E. Davie, "Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 94, 1997, pp. 9058-62.

-
- [106] J.D. Kulman, J.E. Harris, L. Xie, and E.W. Davie, "Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, 2001, pp. 1370-5.
- [107] J. Oldenburg, C.G. Bevans, C.R. Müller, and M. Watzka, "Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1): The Key Protein of the Vitamin K Cycle," *Antioxid Redox Signal*, vol. 8, 2006, pp. 347-53.
- [108] K. Hansson, A.-M. Tha, B. Furie, B.C. Furie, and J. Stenflo, "A Single γ -Carboxyglutamic Acid Residue in a Novel Cysteine-Rich Secretory Protein without Propeptide," *Biochemistry*, vol. 45, 2006, pp. 12828-39.
- [109] A. Giese, R. Jude, H. Kuiper, T. Raudsepp, and F. Piumi, "Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family," *Gene*, vol. 299, 2002, pp. 101-9.
- [110] M.A. Brown, G.S. Begley, E. Czerwiec, L.M. Stenberg, and M. Jacobs, "Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gamma-carboxylation," *Biochemistry*, vol. 44, 2005, pp. 9150-9.
- [111] P. Bandyopadhyay, "Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification," *Vitam Horm*, vol. 78, 2008, pp. 157-84.
- [112] M.A. Rishavy, K.W. Hallgren, A.V. Yakubenko, R.L. Shtofman, K.W. Runge, and K.L. Berkner, "Brønsted Analysis Reveals Lys218 as the Carboxylase Active Site Base That Deprotonates Vitamin K Hydroquinone To Initiate Vitamin K-Dependent Protein," *Biochemistry*, vol. 45, 2006, pp. 13239-48.
- [113] N. Wajih, S.M. Hutson, J. Owen, R. Wallin, and N. Carolina, "Increased Production of Functional Recombinant Human Clotting Factor IX by Baby Hamster Kidney Cells Engineered to Overexpress VKORC1, the Vitamin K 2, 3-Epoxy-reducing Enzyme of the Vitamin K Cycle," *J Biol Chem*, vol. 280, 2005, pp. 31603-7.

-
- [114] Y.-M. Sun, D.-Y. Jin, R.M. Camire, and D.W. Stafford, "Vitamin K epoxide reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X," *Blood*, vol. 106, 2005, pp. 3811-5.
- [115] K.W. Hallgren, E.L. Hommema, B.A. McNally, and K.L. Berkner, "Carboxylase Overexpression Effects Full Carboxylation but Poor Release and Secretion of Factor IX : Implications for the Release of Vitamin K-Dependent," *Biochemistry*, vol. 41, 2002, pp. 15045-55.
- [116] J. Suttie, *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, J.B. Lippincott Company, 1994.
- [117] M. Ishizuka, T. Tanikawa, K.D. Tanaka, M. Heewon, F. Okajima, K.Q. Sakamoto, and S. Fujita, "Pesticide resistance in wild mammals - Mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents -," *J Toxicol Sci*, vol. 33, 2008, pp. 283-91.
- [118] R. Lasseur, C. Longin-Sauvageon, P. Berny, and E. Benoit, "Heterogeneity of the Coumarin Anticoagulant Targeted Vitamin K Epoxide Reduction System. Study of Kinetic Parameters in Susceptible and Resistant Mice (*Mus musculus domesticus*)," *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 20, 2006, pp. 221-9.
- [119] M. Lund, "Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides," *Proceedings Eleventh Vertebrate Pest Conference (D.O. Clark, Ed.)*, 1984, pp. 89-94.
- [120] B.Y.J.H. Greaves, D.S. Shepherd, and R. Quy, "Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations," *J Hyg (Lond)*, vol. 89, 1982, pp. 295-301.
- [121] A.M. Holbrook, J.A. Pereira, R. Labiris, H. McDonald, J.D. Douketis, M. Crowther, and P.S. Wells, "Systematic Overview of Warfarin and Its Drug and Food Interactions," *Arch Intern Med*, vol. 165, 2005, pp. 1095-106.
- [122] L. Jacobs, "Warfarin pharmacology, clinical management, and evaluation of hemorrhagic risk for the elderly," *Clin Geriatr Med*, vol. 22, 2006, pp. 17-32.

-
- [123] M. Wadelius, L. Chen, K. Downes, J. Ghori, S. Hunt, N. Eriksson, O. Wallerman, H. Melhus, C. Wadelius, D. Bentley, and P. Deloukas, "Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose," *Pharmacogenomics J*, vol. 5, 2005, pp. 262-70.
- [124] H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Muramoto, H. Nakahata, S. Kubo, Y. Shimoyama, M. Kajiwara, and H. Echizen, "Determination of unbound warfarin enantiomers in human plasma and 7-hydroxywarfarin in human urine by chiral stationary-phase liquid chromatography with ultraviolet or fluorescence and on-line circular dichroism detection," *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 701, 1997, pp. 71-80.
- [125] E. Rombouts, F. Rosendaal, and F. van Der Meer, "The effect of vitamin K supplementation on anticoagulant treatment," *J Thromb Haemost*, vol. 4, 2006, pp. 691-2.
- [126] E. Sconce, P. Avery, H. Wynne, and F. Kamali, "Vitamin K supplementation can improve stability of anticoagulation for patients with unexplained variability in response to warfarin," *Hematology*, vol. 109, 2007, pp. 2419-23.
- [127] B.F. Gage and Æ.L.J. Lesko, "Pharmacogenetics of warfarin : regulatory , scientific , and clinical issues," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 25, 2008, pp. 45-51.
- [128] L.A. Begent, A.P. Hill, G.B. Steventon, A.J. Hutt, C.J. Pallister, and D.C. Cowell, "Characterization and purification of the vitamin K 1 2,3 epoxide reductase system from rat liver," *J Pharm Pharmacol*, vol. 53, 2001, pp. 481-6.
- [129] J. Ansell, J. Hirsh, L. Poller, H. Bussey, A. Jacobson, and E. Hylek, "The Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists," *Chest*, vol. 126, 2004, p. 204S-33S.
- [130] M. Teichert, M. Eijgelsheim, F. Rivadeneira, R.H.N.V. Schaik, A. Hofman, P.A.G.M.D. Smet, T.V. Gelder, L.E. Visser, and B.H.C. Stricker, "A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage," *Hum Mol Genet*, vol. 18, 2009, pp. 3758-68.
- [131] N. Limdi and D. Veenstra, "Warfarin Pharmacogenetics," *Pharmacotherapy*, vol. 28, 2008, pp. 1084-97.

-
- [132] A. Keréveur, M. Leclercq, M. Trossaërt, J. Dupeyron, F. Parent, M. Horellou, J. Conard, F. Bachmann, and M. Samama, "Vitamin K metabolism in a patient resistant to vitamin K antagonists," *Haemostasis*, vol. 27, 1997, pp. 168-73.
- [133] B.F. Gage, "Pharmacogenetics-Based Coumarin Therapy," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 46, 2006, pp. 467-73.
- [134] G. D'Andrea, R.L.D. Ambrosio, P.D. Perna, M. Chetta, R. Santacroce, V. Brancaccio, E. Grandone, and M. Margaglione, "A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin," *Blood*, vol. 105, 2005, pp. 645-9.
- [135] T. Li, L.A. Lange, X. Li, L. Susswein, B. Bryant, R. Malone, E. Lange, T. Huang, D. Stafford, and J. Evans, "Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation," *J Med Genet*, vol. 43, 2006, pp. 740-4.
- [136] P.H. Reitsma, "VKORC1 gene variation and venous thrombosis: another one bites the dust?," *J Thromb Haemost*, vol. 5, 2007, pp. 2017-9.
- [137] M.J. Rieder, A.P. Reiner, B.F. Gage, D.A. Nickerson, C.S. Eby, H.L. McLeod, D.K. Blough, K.E. Thummel, D.L. Veenstra, and A.E. Rettie, "Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose," *N Engl J Med*, vol. 352, 2005, pp. 2285-93.
- [138] D. Wang, H. Chen, K.M. Momary, L.H. Cavallari, J.A. Johnson, and W. Sadee, "Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement," *Blood*, vol. 112, 2008, pp. 1013-21.
- [139] F. Läßle, O. von Richter, M. Fromm, T. Richter, K. Thon, H. Wisser, E. Griese, M. Eichelbaum, and K. Kivistö, "Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver," *Pharmacogenetics*, vol. 13, 2003, pp. 565-75.
- [140] J. Taube, D. Halsall, and T. Baglin, "Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment," *Blood*, vol. 96, 2000, pp. 1816-9.

- [141] T. Yin and T. Miyata, "Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—Rationale and perspectives," *Thromb Res*, vol. 120, 2007, pp. 1-10.
- [142] M.D. Caldwell, T. Awad, J.A. Johnson, B.F. Gage, M. Falkowski, P. Gardina, J. Hubbard, Y. Turpaz, T.Y. Langae, C. Eby, C.R. King, A. Brower, J.R. Schmelzer, I. Glurich, H.J. Vidaillet, S.H. Yale, K.Q. Zhang, R.L. Berg, and J.K. Burmester, "CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose," *Blood*, vol. 111, 2008, pp. 4106-12.
- [143] N. Limdi, D. Arnett, J. Goldstein, T. Beasley, G. McGwin, B. Adler, and R. Acton, "Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European American and African Americans," *Pharmacogenomics*, vol. 9, 2008, pp. 511-26.
- [144] R. Wallin, S.M. Hutson, D. Cain, A. Sweatt, and D.C. Sane, "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat," *FASEB J*, vol. 15, 2001, pp. 2542-4.
- [145] H. Vorum, X. Liu, P. Madsen, H. Rasmussen, and B. Honoré, "Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its Ca²⁺-binding activity," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1386, 1998, pp. 121-31.
- [146] N. Wajih, S.M. Hutson, and R. Wallin, "siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production," *Blood*, vol. 108, 2006, pp. 3757-60.
- [147] D. Voora, D.C. Koboldt, C.R. King, P.A. Lenzini, C.S. Eby, E. Deych, M. Crankshaw, P.E. Milligan, H.L. Mcleod, S.R. Patel, L.H. Cavallari, P.M. Ridker, G.R. Grice, R.D. Miller, and B.F. Gage, "A Polymorphism in the VKORC1 Regulator Calumenin Predicts Higher Warfarin Dose Requirements in African Americans," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 87, 2010, pp. 445-51.
- [148] M. Vecsler, R. Loebstein, S. Almog, D. Kurnik, B. Goldman, H. Halkin, and E. Gak, "Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin," *Thromb Haemost*, vol. 95, 2006, pp. 205-11.
- [149] G. Ferland, J. Sadowski, and M. O'Brien, "Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects," *J Clin Invest*, vol. 91, 1993, pp. 1761-8.

-
- [150] S.L. Booth, K.E. Broe, D.R. Gagnon, K.L. Tucker, M.T. Hannan, R.R. Mclean, B. Dawson-hughes, P.W.F. Wilson, L.A. Cupples, and D.P. Kiel, "Vitamin K intake and bone mineral density in women and men," *Am J Clin Nutr*, vol. 77, 2003, pp. 512-6.
- [151] S.L. Booth, K.L. Tucker, H. Chen, M.T. Hannan, D.R. Gagnon, L.A. Cupples, P.W.F. Wilson, J. Ordovas, E.J. Schaefer, B. Dawson-hughes, and D.P. Kiel, "Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women," *Am J Clin Nutr*, vol. 71, 2000, pp. 1201-8.
- [152] OMIM_277450, "VITAMIN K-DEPENDENT CLOTTING FACTORS, COMBINED DEFICIENCY OF, 1; VKCFD1."
- [153] OMIM 607473, "VITAMIN K-DEPENDENT CLOTTING FACTORS, COMBINED DEFICIENCY OF, 2; VKCFD2."
- [154] B. Zhang and D. Ginsburg, "Familial multiple coagulation factor deficiencies : new biologic insight from rare genetic bleeding disorders," *J Thromb Haemost*, vol. 2, 2004, pp. 1564-72.
- [155] B.A.M. Soute, H.M.H. Spronk, V.P. Mutucumarana, J. Lin, T.M. Hackeng, D. Stafford, and C. Vermeer, "Characteristics of recombinant W501S mutated human gamma-glutamyl carboxylase," *J Thromb Haemost*, vol. 2, 2004, pp. 597-604.
- [156] R. Kimura, Y. Kokubo, K. Miyashita, R. Otsubo, K. Nagatsuka, T. Otsuki, T. Sakata, J. Nagura, A. Okayama, K. Minematsu, H. Naritomi, S. Honda, K. Sato, H. Tomoike, and T. Miyata, "Polymorphisms in Vitamin K-Dependent γ -Carboxylation-Related Genes Influence Interindividual Variability in Plasma Protein C and Protein S Activities in the General Population," *Int J Hematol*, vol. 84, 2006, pp. 387-97.
- [157] Z.-W. Zhou, T. Mushiroda, A. Takahashi, S. Saito, H. Shimomura, T. Suzuki, N. Kamatani, and Y. Nakamura, "High-resolution SNP and haplotype maps of the human gamma-glutamyl carboxylase gene (GGCX) and association study between polymorphisms in GGCX and the warfarin maintenance dose requirement of the Japanese population," *Journal of Human Genetics*, vol. 52, 2007, pp. 856-64.

- [158] D. Darghouth, K.W. Hallgren, R.L. Shtofman, A. Mrad, Y. Gharbi, A. Maherzi, R. Kastally, S. Lericousse, K.L. Berkner, and J.-P. Rosa, "Compound heterozygosity of novel missense mutations in the gamma-glutamyl-carboxylase gene causes hereditary combined vitamin K – dependent coagulation factor deficiency," *Blood*, vol. 108, 2006, pp. 1925-31.
- [159] J. Oldenburg, M. Watzka, S. Rost, and C.R. Müller, "VKORC1: molecular target of coumarins," *J Thromb Haemost*, vol. 4, 2007, pp. 1-6.
- [160] G. Marchetti, P. Caruso, B. Lunghi, M. Pinotti, M. Lapecorella, M. Napolitano, A. Canella, G. Mariani, and F. Bernardi, "Vitamin k-induced modification of coagulation phenotype in *vkorc1* homozygous deficiency," *J Thromb Haemost*, vol. 6, 2008, pp. 797-803.
- [161] R. Montes, E. Ruiz De Gaona, M. Martínez-González, I. Alberca, and J. Hermida, "The c.-1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients," *Br J Haematol*, vol. 133, 2006, pp. 183-7.
- [162] K. Obayashi, K. Nakamura, J. Kawana, H. Ogata, K. Hanada, M. Kurabayashi, A. Hasegawa, K. Yamamoto, and R. Horiuchi, "VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 80, 2006, pp. 169-78.
- [163] Y. Wang, W. Zhang, Y. Zhang, Y. Yang, L. Sun, S. Hu, J. Chen, C. Zhang, Y. Zheng, Y. Zhen, K. Sun, C. Fu, T. Yang, J. Wang, J. Sun, H. Wu, W.C. Glasgow, and R. Hui, "VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease and aortic dissection)," *Circulation*, vol. 113, 2006, pp. 1615-21.
- [164] A. Erkkilä, S.L. Booth, F.B. Hu, P.F. Jacques, J.E. Manson, K.M. Rexrode, M.J. Stampfer, and A.H. Lichtenstein, "Phylloquinone intake as a marker for coronary heart disease risk but not stroke in women," *Eur J Clin Nutr*, vol. 59, 2005, pp. 196-204.
- [165] B. Brenner, B. Sanchez-Vega, S.-M. Wu, N. Lanir, D.W. Stafford, and J. Solera, "A Missense Mutation in gamma-Glutamyl Carboxylase Gene Causes Combined Deficiency of All Vitamin K-Dependent Blood Coagulation Factors," *Blood*, vol. 92, 1998, pp. 4554-9.

-
- [166] H.M.H. Spronk, R.A. Farah, G.R. Buchanan, C. Vermeer, and B.A.M. Soute, "Novel mutation in the gamma-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors," *Gene*, vol. 96, 2000, pp. 3650-2.
- [167] S. Rost, H.-J. Pelz, S. Menzel, A.D. Macnicoll, K.-J. Song, and J. Oldenburg, "Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin?," *BMC Genet*, vol. Feb 6, 2009, p. 10:4.
- [168] S. Rost, C. Geisen, A. Fregin, E. Seifried, C. Müller, and J. Oldenburg, "Founder mutation Arg485Pro led to recurrent compound heterozygous GGCX genotypes in two German patients with VKCFD type 1," *Blood Coagul Fibrinolysis*, vol. 17, 2006, pp. 503-7.
- [169] D. Savage and J. Lindenbaum, "Relapses after interruption of cyanocobalamin therapy in patients with pernicious anemia," *Am J Med*, vol. 74, 1983, pp. 765-72.
- [170] M.J. Shearer, "Vitamin K deficiency bleeding (VKDB) in early infancy," *Blood*, vol. 23, 2009, pp. 49-59.
- [171] M. Howe, H. Lipson, R. Ouvrier, and S. Webster, "Severe Cervical Dysplasia and Nasal Cartilage Calcification Following Prenatal Warfarin Exposure," *Am J Med Genet*, vol. 71, 1997, pp. 391-6.
- [172] P. Khau Van Kien, A. Nivelon-Chevallier, F.G. Spagnolo, S. Douvier, and C. Maingueneau, "Vitamin K Deficiency Embryopathy," *Am J Med Genet*, vol. 79, 1998, pp. 66-8.
- [173] M. Kaneki, T. Hosoi, Y. Ouchi, and H. Orimo, "Pleiotropic actions of vitamin K : protector of bone health and beyond?," *Nutrition*, vol. 22, 2006, pp. 845-52.
- [174] C. Vermeer and L. Braam, "Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification," *J Bone Miner Metab*, vol. 19, 2001, pp. 201-6.
- [175] T. Neogi, S.L. Booth, Y.Q. Zhang, P.F. Jacques, R. Terkeltaub, P. Aliabadi, and D.T. Felson, "Low Vitamin K Status Is Associated With Osteoarthritis in the Hand and Knee," *Arthritis Rheum*, vol. 54, 2006, pp. 1255-61.

-
- [176] J.G. Hall, R.M. Pauli, and K.M. Wilson, "Maternal and Fetal Sequelae of Anticoagulation During Pregnancy," *Am J Med*, vol. 68, 1980, pp. 122-40.
- [177] H. Menger, A.E. Lin, H.V. Toriello, G. Bernert, and J.W. Spranger, "Vitamin K Deficiency Embryopathy: A Phenocopy of the Warfarin Embryopathy Due to a Disorder of Embryonic Vitamin K Metabolism," *Am J Med Genet*, vol. 72, 1997, pp. 129-34.
- [178] W. Shaul, H. Emery, and J. Hall, "Chondrodysplasia punctata and maternal warfarin use during pregnancy.," *Am J Dis Child*, vol. 129, 1975, pp. 360-2.
- [179] J. Pettifor and R. Benson, "Congenital malformations associated with the administration of oral anticoagulants during pregnancy," *J Pediatr*, vol. 86, 1975, pp. 459-62.
- [180] K. Becker, N. Csikos, A. Horvath, and S. Karpati, "Identification of a novel mutation in 3beta-hydroxysteroid-delta8-delta7-isomerase in a case of Conradi-Hünemann-Happle syndrome," *Exp Dermatol*, vol. 10, 2001, pp. 286-9.
- [181] M. Harrod and P. Sherrod, "Warfarin embryopathy in siblings," *Obstet Gynecol*, vol. 57, 1981, pp. 673-6.
- [182] OMIM_118650, "CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA, AUTOSOMAL DOMINANT."
- [183] OMIM 302960, "CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA 2, X-LINKED DOMINANT; CDPX2."
- [184] M. Hello, A. David, and S. Barbarot, "Conradi-Hünemann-Happle syndrome with unilateral distribution," *Ann Dermatol Venerol*, vol. 137, 2010, pp. 44-7.
- [185] N. Braverman, P. Lin, F.F. Moebius, C. Obie, A. Moser, H. Glossmann, W.R. Wilcox, D.L. Rimoin, M. Smith, L. Kratz, R.I. Kelley, and D. Valle, "Mutations in the gene encoding 3 beta-hydroxysteroid-delta 8, delta 7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hünemann syndrome," *Nat Genet*, vol. 22, 1999, pp. 291-4.
- [186] F.F. Moebius, B.U. Fitzky, G. Wietzorrek, A. Haidekker, A. Eder, and H. Glossmann, "Cloning of an emopamil-binding protein (EBP)-like protein that lacks sterol delta 8 - delta 7 isomerase activity," *Biochem. J.*, vol. 237, 2003, pp. 229-37.

-
- [187] K. Okiyama, D.H. Smith, M.J. Thomas, and T.K. McIntosh, "Evaluation of a novel calcium channel blocker, (S)-emopamil, on regional cerebral edema and neurobehavioral function after experimental brain injury," *J Neurosurg*, vol. 77, 1992, pp. 607-15.
- [188] OMIM_302950, "CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA 1, X-LINKED RECESSIVE; CDPX1."
- [189] OMIM_215100, "RHIZOMELIC CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA, TYPE 1; RCDP1."
- [190] OMIM_222765, "RHIZOMELIC CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA, TYPE 2; RCDP2."
- [191] OMIM_602497, "CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA, BRACHYTELEPHALANGIC, AUTOSOMAL."
- [192] OMIM_118651, "CHONDRODYSPLASIA PUNCTATA, TIBIA-METACARPAL TYPE."
- [193] R. Wallin and S.M. Hutson, "Warfarin and the Vitamin K-Dependent gamma-Carboxylation System," *Trends Mol Med*, vol. 10, 2004, pp. 299-302.
- [194] J. Cadamuro, B. Dieplinger, T. Felder, and I. Kedenko, "Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements," *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 66, 2010, pp. 253-60.
- [195] C.-T. Chien, P.L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields, "The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, 1991, pp. 9578-82.
- [196] N. Johnsson and A. Varshavsky, "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 91, 1994, pp. 10340-4.
- [197] S. Fields and O.-K. Song, "A novel genetic system to detect protein-protein interactions," *Nature*, vol. 340, 1989, pp. 245-6.

-
- [198] I. Stagljar, C. Korostensky, N. Johnsson, and S.T. Heesen, "A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 95, 1998, pp. 5187-92.
- [199] S. Wittke, N. Lewke, S. Mu, and N. Johnsson, "Probing the Molecular Environment of Membrane Proteins In Vivo," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 10, 1999, pp. 2519 -30.
- [200] D. Auerbach, B. Galeuchet-Schenk, M. Hottiger, and I. Stagljar, "Genetic approaches to the identification of interactions between membrane proteins in yeast," *J Recept Signal Transduct Res*, vol. 22, 2002, pp. 471-81.
- [201] M. Dünwald, A. Varshavsky, and N. Johnsson, "Detection of Transient In Vivo Interactions between Substrate and Transporter during Protein Translocation into the Endoplasmic Reticulum," *Mol Biol Cell*, vol. 10, 1999, pp. 329 -44.
- [202] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase," *Science*, vol. 239, 1988, pp. 487-91.
- [203] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. COULSON, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 74, 1977, pp. 5463-7.
- [204] E.M. Phizicky and S. Fields, "Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis," *Microbiol Rev*, vol. 59, 1995, pp. 94-123.
- [205] P.D. Adams, "Protein-Protein Interactions – A Molecular Cloning Manual," *Identification of Associated Proteins by Coimmunoprecipitation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, pp. 59-74.
- [206] D.C. Liebler, "Introduction to Proteomics, Tools for the New Biology," *Identifying protein-protein interactions and protein complexes*, Humana Press, 2002, pp. 151-65.
- [207] S. Rost, A. Fregin, M. Hünerberg, C.G. Bevans, C.R. Müller, and J. Oldenburg, "Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1," *Thromb Haemost*, vol. 94, 2005, pp. 780-6.

- [208] S. Silve, P.H. Dupuy, C. Labit-Lebouteiller, M. Kaghad, P. Chalon, A. Rahier, M. Taton, J. Lupker, D. Shire, and C. Loison, "Emopamil-binding Protein, a Mammalian Protein That Binds a Series of Structurally Diverse Neuroprotective Agents, Exhibits delta8-delta7 Sterol Isomerase Activity in Yeast*," *J Biol Chem*, vol. 271, 1996, pp. 22434-40.
- [209] O. Hori, M. Miyazaki, T. Tamatani, K. Ozawa, K. Takano, M. Okabe, M. Ikawa, E. Hartmann, P. Mai, D.M. Stern, Y. Kitao, and S. Ogawa, "Deletion of SERP1/RAMP4, a Component of the Endoplasmic Reticulum (ER) Translocation Sites, Leads to ER Stress," *Mol Cell Biol*, vol. 26, 2006, pp. 4257-67.
- [210] T. Hayano and M. Kikuchi, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding human P5," *Gene*, vol. 164, 1995, pp. 377-8.
- [211] B. Gwynn, E.M. Eicher, and L.L. Peters, "Genetic localization of Cd63, a member of the transmembrane 4 superfamily, reveals two distinct loci in the mouse genome," *Genomics*, vol. 35, Jul. 1996, pp. 389-91.
- [212] T. Yin, H. Hanada, K. Miyashita, Y. Kokubo, Y. Akaiwa, R. Otsubo, K. Nagatsuka, T. Otsuki, A. Okayama, K. Minematsu, H. Naritomi, H. Tomoike, and T. Miyata, "No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population," *Thromb Res*, vol. 122, 2008, pp. 179-84.
- [213] E.F. Hildebrandt, P.C. Preusch, J.L. Patterson, J.W. Sutt, and M. Rat, "Solubilization and Characterization of Vitamin K Epoxide Reductase Normal and Warfarin-Resistant Rat Liver Microsomes," *Biophysics*, vol. 228, 1984, pp. 489-92.
- [214] C.R. Wilson, J.-M. Sauer, G.P. Carlson, R. Wallin, M.P. Ward, and S.B. Hooser, "Species comparison of vitamin K1 2,3-epoxide reductase activity in vitro: kinetics and warfarin inhibition," *Toxicol*, vol. 189, 2003, pp. 191-8.
- [215] C.R. Wilson, J.-michael Sauer, G.P. Carlson, R. Wallin, M.P. Ward, and S.B. Hooser, "Species comparison of vitamin K 1 2,3-epoxide reductase activity in vitro: kinetics and warfarin inhibition," *Toxicology*, vol. 189, 2003, pp. 191-198.

- [216] J. Claverie, "Gene number. What if there are only 30,000 human genes?," *Science*, vol. 291, 2001, pp. 1255-7.
- [217] P. Braun, M. Tasan, M. Dreze, M. Barrios-Rodiles, I. Lemmens, H. Yu, J.M. Sahalie, R.R. Murray, L. Roncari, A.-S.D. Smet, K. Venkatesan, J.-franc Rual, J. Vandenhoute, M.E. Cusick, T. Pawson, D.E. Hill, J. Tavernier, J.L. Wrana, F.P. Roth, and M. Vidal, "An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions," *Nat Methods*, vol. 6, 2010, pp. 91-97.
- [218] Y.-C. Chen, S.V. Rajagopala, T. Stellberger, and P. Uetz, "Exhaustive benchmarking of the yeast two-hybrid system," *Nat Methods*, vol. 7, Sep. 2010, pp. 667-8.
- [219] E. Marras, A. Travaglione, G. Chaurasia, M. Futschik, and E. Capobianco, "Inferring modules from human protein interactome classes," *BMC Syst Biol*, vol. 4, Jul. 2010, p. 102.
- [220] M. Hirode, K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, T. Shimuzu, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno, and T. Urushidani, "Gene expression profiling in rat liver treated with various hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy," *J Toxicol Sci*, vol. 34, 2009, pp. 281-93.
- [221] P. Westhofen, "Funktionelle Untersuchungen zur zellulären Antioxidation und Lokalisierung der Vitamin K 2,3-Epoxid Reduktase C1 L1," 2009.
- [222] K. Mukai, H. Morimoto, S. Kikuchi, and S. Nagaoka, "Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution," *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1157, 1993, pp. 313-7.
- [223] J. Li, J.C. Lin, H. Wang, J.W. Peterson, B.C. Furie, B. Furie, S.L. Booth, J.J. Volpe, and P.A. Rosenberg, "Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to Developing Oligodendrocytes and Neurons," *J Neurosci*, vol. 23, 2003, pp. 5816-26.
- [224] J. Oldenburg, B. von Brederlow, A. Fregin, S. Rost, W. Wolz, W. Eberl, S. Eber, E. Lenz, R. Schwaab, H. Brackmann, W. Effenberger, U. Harbrecht, L. Schurgers, C. Vermeer, and C. Müller, "Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex," *Thromb Haemost*, vol. 84, 2000, pp. 937-41.

-
- [225] A. Yamaguchi, O. Hori, D.M. Stern, E. Hartmann, S. Ogawa, and M. Tohyama, "Stress-associated Endoplasmic Reticulum Protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated Membrane Protein 4 (RAMP4) Stabilizes Membrane Proteins during Stress and Facilitates Subsequent Glycosylation," *Cell*, vol. 147, 1999, pp. 1195-204.
- [226] I. Nagamori, K. Yomogida, M. Ikawa, M. Okabe, N. Yabuta, and H. Nojima, "The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis," *Genes Cells*, vol. 11, 2006, pp. 1161-71.
- [227] V. Favaloro, M. Spasic, B. Schwappach, and B. Dobberstein, "Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins," *J Cell Sci*, vol. 121, 2008, pp. 1832-40.
- [228] B. Wilkinson and H.F. Gilbert, "Protein disulfide isomerase," *Biochemistry*, vol. 1699, 2004, pp. 35-44.
- [229] F. Hatahet and L.W. Ruddock, "Protein Disulfide Isomerase : A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation," *Antioxid Redox Signal*, vol. 11, 2009, pp. 2807-50.
- [230] C. Laggner, C. Schieferer, B. Fiechtner, G. Poles, R.D. Hoffmann, H. Glossmann, T. Langer, and F.F. Moebius, "Discovery of High-Affinity Ligands of σ_1 Receptor, ERG2, and Emopamil Binding Protein by Pharmacophore Modeling and Virtual Screening," *J Med Chem*, vol. 48, 2005, pp. 4754-64.
- [231] J.M.J. Derry, E. Gormally, G.D. Means, W. Zhao, A. Meindl, R.I. Kelley, Y. Boyd, and G.E. Herman, "Mutations in a gamma8-gamma7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata," *Nat Genet*, vol. 22, 1999, pp. 286-90.
- [232] A. Kolb-Mäurer, K.-H. Grzeschik, D. Haas, E.-B. Bröcker, and H. Hamm, "Conradi-Hünemann-Happle Syndrome (X-linked Dominant Chondrodysplasia Punctata) Confirmed by Plasma Sterol and Mutation Analysis," *Acta Derm Venereol*, vol. 88, 2008, pp. 47-51.
- [233] J.S. Ginsberg, I. Greer, and J. Hirsh, "Use of Antithrombotic Agents During Pregnancy," *Chest*, vol. 119, 2001, p. 122S-31S.

-
- [234] K. Moore, T.V.N. Persaud, and C. Viebahn, *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 2007.
- [235] D.W. Essex, K. Chen, and M. Swiatkowska, "Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane," *Blood*, vol. 86, Sep. 1995, pp. 2168-73.
- [236] C. Appenzeller-Herzog and L. Ellgaard, "The human PDI family: versatility packed into a single fold," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1783, Apr. 2008, pp. 535-48.
- [237] L. Ellgaard and L.W. Ruddock, "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties," *EMBO Rep*, vol. 6, 2005, pp. 28-32.
- [238] C.E. Jessop, R.H. Watkins, J.J. Simmons, M. Tasab, and N.J. Bulleid, "Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins.," *Journal of cell science*, vol. 122, Dec. 2009, pp. 4287-95.
- [239] P.A. Jordan, J.M. Stevens, G.P. Hubbard, N.E. Barrett, T. Sage, K.S. Authi, and J.M. Gibbins, "A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function," *Platelets*, vol. 105, 2005, pp. 1500-7.
- [240] OMIM_134850, "FIBRINOGEN, G GAMMA POLYPEPTIDE; FGG."
- [241] J. Hawiger, S. Timmons, M. Kloczewiak, D. Strong, and R. Doolittle, "gamma and alpha chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 79, 1982, pp. 2068-71.
- [242] M.E. Hemler, "Tetraspanin functions and associated microdomains," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, Oct. 2005, pp. 801-11.
- [243] L. Källquist, M. Hansson, A.-M. Persson, H. Janssen, J. Calafat, H. Tapper, and I. Olsson, "The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase," *Blood*, vol. 112, 2008, pp. 3444-54.
- [244] S. Levy and T. Shoham, "The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes," *Nat Rev Immunol*, vol. 5, Feb. 2005, pp. 136-48.

-
- [245] N. Anzai, Y. Lee, B.-S. Youn, S. Fukuda, Y.-J. Kim, C. Mantel, M. Akashi, and H.E. Broxmeyer, "C-kit associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors," *Blood*, vol. 99, Jun. 2002, pp. 4413-21.
- [246] C. Hammond, L.K. Denzin, M. Pan, J. M, H.J. Geuze, P. Cresswell, and P. Cresswell, "The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules," *J Immunol*, vol. 161, 1998, pp. 3282-91.
- [247] F. Berditchevski, "Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye," *J Cell Sci*, vol. 114, Dec. 2001, pp. 4143-51.
- [248] M.J. Metzelaars, P.L.J. Wijngaardg, P.J. Petersll, J.J. Sixma, H.K. Nieuwenhuiss, and H.C. Cleversb, "CD63 Antigen," *J Biol Chem*, vol. 266, 1991, pp. 3239-45.
- [249] M. Gullberg and A.-C. Andersson, "Visualization and quantification of protein-protein interactions in cells and tissues," *Nat methods*, vol. 7, 2010, p. Application Note.
- [250] C. Banning, J. Votteler, D. Hoffmann, H. Koppensteiner, M. Warmer, R. Reimer, F. Kirchhoff, U. Schubert, J. Hauber, and M. Schindler, "A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells," *PLoS one*, vol. 5, Jan. 2010, p. e9344.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Blutgerinnungskaskade	5
Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Vitamin K Derivate	7
Abbildung 3: Der Vitamin K-Zyklus	9
Abbildung 4: Das Modell des VKOR-PDI-Redoxkomplexes	11
Abbildung 5: Strukturmodell von VKORC1	13
Abbildung 6: CLUSTAL W (2.0.12) multiple sequence alignment von VKORC1 und VKORC1L1	15
Abbildung 7: Die Struktur der γ-Glutamyl-Carboxylase (GGCX)	16
Abbildung 8: Der schematische Aufbau der Vitamin K-abhängigen Proteine	18
Abbildung 9: 4-Hydroxycoumarin und seine Derivate	21
Abbildung 10: Das Split-Ubiquitin Prinzip	29
Abbildung 11: HPLC-Auftrennung von Vitamin K-Epoxid und -Chinon	56
Abbildung 12: Vitamin K1-Chinon Eichgerade	66
Abbildung 13: Vitamin K2- Chinon Eichgerade	66
Abbildung 14: Optimierung des VKORC1L1-Volumens	67
Abbildung 15: VKOR-Enzymassay bei unterschiedlichen pH-Werten	68
Abbildung 16: VKORC1L1-Assay mit unterschiedlichen Konzentrationen an CHAPS	69
Abbildung 17: Kinetik von VKORC1L1 mit Vitamin K1-Chinon als Substrat	71
Abbildung 18: Kinetik von VKORC1L1 mit Vitamin K2-Chinon als Substrat	72
Abbildung 19: Vergleich der Kinetik mit den Substraten VKO1 und VKO2	72
Abbildung 20: VKO1 in Konkurrenz zu VKO2	73
Abbildung 21: Zeitabhängigkeit der VKORC1L1- Aktivität mit und ohne Hemmung durch 10μM Warfarin	74
Abbildung 22: Hemmung der VKORC1L1 durch unterschiedliche Warfarin Konzentrationen mit VKO1 als Substrat	75
Abbildung 23: Hemmung der VKORC1L1 durch unterschiedliche Warfarin Konzentrationen mit VKO2 als Substrat	76
Abbildung 24: VKORC1L1-Hemmung durch Warfarin mit unterschiedlichen Substraten	77

Abbildung 25: VKO1-Umsatz bei Austausch der Cysteine in Serin.	78
Abbildung 26: VKO2-Umsatz bei Austausch der Cysteine in Serin.	78
Abbildung 27: Vergleich der relativen VKORC1L1-Umsätze mit den beiden Vitamin K-Chinonen als Substraten (jeweils auf 100 % Aktivität des Wildtyps bezogen)	79
Abbildung 28: Vergleich der absoluten VKORC1L1-Umsätze mit den beiden Vitamin K-Chinonen als Substraten.	79
Abbildung 29: Nachweis der VKOR-„Köder“-Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, Stamm NMY32.	82
Abbildung 30: Nachweis der GGCX-„Köder“-Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, Stamm NMY32.	83
Abbildung 31: VKORC1-Treffer im β-Galaktosidase Assay.	85
Abbildung 32: VKORC1L1-Treffer im β-Galaktosidase Assay.	86
Abbildung 34: VKORC1-Einzelklon Interaktions-Analyse.	92
Abbildung 34: VKORC1L1-Einzelklon Interaktions-Analyse.	93
Abbildung 36: Immunpräzipitation mit Myc-Agarose und Nachweis mit anti-Myc-Antikörper.	95
Abbildung 37: Immunpräzipitation mit Flag-Agarose und anti-Flag-Antikörper.	96
Abbildung 38: Myc-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner mittels anti-Flag Antikörpers.	97
Abbildung 39: Flag-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner VKORC1, VKORC1L1 und PDIA6 mittels anti-Myc Antikörpers.	98
Abbildung 40: Flag-IP und Nachweis der potentiellen Interaktionspartner VKORC1, VKORC1L1, SERP1 und EBP mittels anti-Myc Antikörpers.	98
Abbildung 41: Kolokalisation von VKORC1 mit den Kandidaten ohne Tag-spezifischen primär-Antikörper.	100
Abbildung 42: Kolokalisation von VKORC1 und VKORC1L1.	101
Abbildung 42: Kolokalisation von VKORC1 und CD63, PDIA6, SERP1, EBP und FGG.	102
Abbildung 43: Strukturvergleich des Vitamin K und des Inhibitors Warfarin.	109
Abbildung 44: VKORC1-Mutagenesestudie (Rost et al. 2005)	110
Abbildung 45: VKORC1L1-Mutagenesestudie	111
Abbildung 46: Liste der vorhergesagten VKORC1-Interaktionskandidaten. (STRING, Version 8.3)	113

Abbildung 47: Phylogenetischer Baum der VKOR-Familie (Schwarz et al. 2009).....	116
Abbildung 48: Einflüsse hepatotoxischer Medikamente auf die Expression von verschiedenen Genen der Blutgerinnung (Hirode et al. 2009).....	117
Abbildung 49: Modell der SERP1 - VKORC1 Interaktion	119
Abbildung 50: EBP-VKOR-Interaktionsmodell	121
Abbildung 52: GGCX Interaktionsvorhersage mittels STRING Version 8.3, Juni 2010	128

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klonierungsprimer	32
Tabelle 2: Sequenzierprimer	33
Tabelle 3: Mutageneseprimer	33
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	61
Tabelle 5: Erwartete Ergebnisse bei positiven Funktionalitäts-Assays	81
Tabelle 6: Liste der VKORC1-Interaktionstreffer	89
Tabelle 7: Liste der VKORC1L1-Interaktionstreffer	90
Tabelle 8: Interessante Kandidaten, die häufig von VKORC1 und VKORC1L1 gefunden wurden	91
Tabelle 9: Konstrukt-Größen in kDa	94
Tabelle 10: Vergleich VKORC1 – und VKORC1L1-Kinetiken	106
Tabelle 11: Publizierte VKORC1-Kinetik-Parameter	107
Tabelle 12: Berechnete IC₅₀-Werte	108
Tabelle 13: Überblick der PDI-Familie (Homo sapiens)	123
Tabelle 14: Überschneidungen der Ergebnisse von VKORC1 und VKORC1L1	127

5.4 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
CDS	für ein Protein kodierende Sequenz (engl. coding sequence)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBP	Emopamil Binding Protein
EC	extrazelluläre Domäne (engl. extracellular domain)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERO 1	Endoplasmatischen-Retikulum-Oxidase 1
FCS	fötale Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FGG	Fibrinogen G Gamma Polypeptid
G418	Geneticin
GGCX	γ -Glutamyl-Carboxylase
Gla	γ -Carboxyglutaminreste
Glu	γ -Carboxyglutamatreste
KH2	Vitamin K Hydrochinon
KM	Michaelis Menten Konstante
LB	Luria-Bertani
LEL	große extrazelluläre Schleife (engl. large extracellular loop)
MCS	multiple Klonierstelle (engl. multiple cloning site)
MEM	Minimum Essential Medium
MGP	Matrix-Gla-Protein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
NEAA	Non-Essential Amino Acid
NEM	N-Ethylmaleimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
[S]	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)

SERP1	Stress-assoziiertes Endoplasmische Retikulum Protein 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphismen
SUS	Split-Ubiquitin-System
TF	Gewebebefaktor (engl. tissue factor)
TM	Transmembrandomäne
UBP	Ubiquitin-spezifische Proteasen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V_0	initiale Reaktionsgeschwindigkeit
VKD	Vitamin K-abhängigen (engl. Vitamin K dependent)
VKR	Vitamin K-Reduktase
VKO	Vitamin K Epoxid
VKOR	Vitamin K-Epoxid-Reduktase
VKORC1	Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1
VKORC1L1	Vitamin K-Epoxid-Reduktase Komplex 1-like 1
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	Gewicht pro Volumen
γ -CRS	γ -Carboxylase-Erkennungsregion (engl. γ -carboxylase recognition site)

Einheiten

A	Ampère
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
min	Minute
m	Milli
n	Nano
rpm	Runden pro Minuten
RT	Raum Temperatur
s	Sekunden
U	Units
V	Volt
vol	Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung
μ	Mikro

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich

- Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-Reible für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik durchführen zu können. Auch danke ich ihm für seine sehr gute Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Georg Krone vom Lehrstuhl für Zoologie I für seine freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.
- Herrn Prof. Dr. Johannes Oldenburg, Leiter des Instituts für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Bonn, und seiner Arbeitsgruppe für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.
- Allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Müller-Reible für die angenehme Arbeitsatmosphäre und besonders Simone Rost für ihre Hilfe.
- Der ehemaligen Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ute Felbor am Institut für Humangenetik und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Scharl, Leiter des Instituts für Physiologische Chemie I, für deren fachliche und besonders persönliche Unterstützung.
- Meiner Familie – der größten Stütze überhaupt – und hier ganz besonders meinem Mann, Maximilian Schaafhausen, für alles, was er während der Doktorarbeit für mich war: der beste wissenschaftliche Kollege und größte Motivator.

PUBLIKATIONEN

Schaafhausen A, Rost S, Oldenburg J, Müller CR, “Identification of VKORC1 interaction partners by split-ubiquitin system and coimmunoprecipitation,” *Thromb Haemost*, vol. 105, 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]

Gaetzner S, Stahl S, Sürücü O, **Schaafhausen A**, Halliger-Keller B, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U, „CCM1 gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation,“ *Neurosurg*, vol. 30, 2007, pp.155-9

ERKLÄRUNG

Gemäß §4, Abs. 3, Ziff. 3, 5 und 8

der Promotionsordnung der

Fakultät für Biologie der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vom 15. März 1999

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass ich außer den mit Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Dezember 2010

Anne Schaafhausen